

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. J. Kalich)
Arbeit unter Anleitung von Prof. Dr. K. Tempel

Physikalisch-chemische Methoden zur Charakteri-
sierung von Desoxyribonucleinsäure nach Einwirkung
von Röntgenstrahlen und
2,4,6-Triäthylenimino-1,3,5-triazin in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär - medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von
Andrew Ozdy
aus Budapest

München 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0045

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. J. Kalich)
Arbeit unter Anleitung von Prof. Dr. K. Tempel

Physikalisch-chemische Methoden zur Charakteri-
sierung von Desoxyribonucleinsäure nach Einwirkung
von Röntgenstrahlen und
2,4,6-Triäthylenimino-1,3,5-triazin in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär - medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von

Andrew Ozdy

aus Budapest

München 1973

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme
Referent: Prof. Dr. K. Tempel
Korreferent: Prof. DDr. DDr.h.c. J. Brüggemann



Tag der Promotion: 27. Juli 1973

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. PROBLEMSTELLUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1. Bau und Funktion der Nucleinsäuren	2
2.2. Physikalisch-chemische Grundlagen der Wirkung ionisierender Strahlen	5
2.2.1. Strahlenarten	5
2.2.2. Strahlenabsorption	5
2.2.3. Verteilung der absorbierten Strahlenenergie	6
2.2.4. Direkte Strahlenwirkung - Treffertheorie	6
2.2.5. Indirekte Strahlenwirkung - Radikaltheorie	7
2.2.5.1. Radikale bei Bestrahlung von sauerstofffreiem Wasser	8
2.2.5.2. Radikale bei Bestrahlung von sauerstoffhaltigem Wasser	9
2.2.5.3. Reaktionsmöglichkeiten organischer Radikale in Gegenwart von Sauerstoff	9
2.3. Zur Wirkung von ionisierenden Strahlen auf DNA	10
2.3.1. In vitro	10
2.3.1.1. Veränderungen an den Basen	10
2.3.1.2. Veränderungen am Zucker	11
2.3.1.3. Brüche in den Polynucleotidketten	11
2.3.1.4. Intermolekulare Vernetzungen	11
2.3.1.5. Zerstörung der Wasserstoffbindungen	12
2.3.1.6. Beteiligter Mechanismus - Radikale	13
2.3.1.7. Quantitative Aspekte	13
2.3.1.8. Starter-Aktivität der DNA gegenüber der DNA- und RNA-Polymerase-Reaktion	14
2.3.2. In vivo	14
2.3.2.1. Viskosimetrischer Nachweis	15
2.3.2.2. Chromatographischer Nachweis	15
2.3.2.3. Nachweis mithilfe der Sedimentationsanalyse	15

	Seite
2.3.2.4. Zur Bedeutung der Befunde für die DNA-Funktion	16
2.4. Physikalisch-chemische Grundlagen der Wirkung von Radiomimetika	16
2.5. Zur Wirkung von Radiomimetika auf DNA	18
2.5.1. In vitro	18
2.5.2. In vivo	19
2.6. Zum Wirkungsmechanismus von Actinomycin D	20
2.7. Zur Metachromasie von Toluidinblau (TB) an Polyanionen	23
3. MATERIAL UND METHODIK	26
3.1. Reagentien und Tiermaterial	26
3.1.1. Reagentien	26
3.1.2. Tiermaterial	28
3.1.3. Fütterung der Versuchstiere	28
3.1.4. Behandlung der Tiere	28
3.1.4.1. Bestrahlung	28
3.1.4.2. Applikation von Triäthylenmelamin [®] (TEM)	28
3.1.4.3. Applikation von Actinomycin D	29
3.1.5. Haltung der Tiere während der Versuche	29
3.1.6. Aufarbeitung der Tiere	29
3.1.7. DNA-Isolierung	29
3.1.7.1. Lösungen	29
3.1.7.2. Verarbeitung der Organe	30
3.1.7.3. Homogenisation	30
3.1.7.4. DNA-Extraktion	30
3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	31
3.2.1. Prinzip	31
3.2.2. Lösungen	32
3.2.3. Ausführung	32
3.2.4. Berechnung der Proteinkonzentration	32
3.3. Messung der Konzentration von DNA	32
3.3.1. Prinzip	33
3.3.2. Lösungen	33
3.3.3. Ausführung	33

	Seite
3.3.4. Berechnung der DNA-Konzentration	34
3.4. Metachromasie von Toluidinblau an DNA	34
3.4.1. Prinzip	34
3.4.2. Lösungen	35
3.4.3. Ausführung	35
3.5. Chromatographische Untersuchungen	36
3.5.1. Prinzip	36
3.5.2. Lösungen	36
3.5.3. Ausführung	37
3.6. Viskosimetrische Untersuchungen	37
3.6.1. Ausführung	38
3.7. Denaturierung von DNA	38
3.7.1. Denaturierung von DNA durch Hitze	38
3.7.1.1. Prinzip	38
3.7.1.2. Ausführung	39
3.8. Fehlerberechnung und Signifikanzanalyse	39
4. ERGEBNISSE	40
4.1. In vitro-Versuche	41
4.1.1. Metachromasie von TB an DNA	41
4.1.2. Metachromasie von TB an denaturierter DNA	41
4.1.2.1. Denaturierung der DNA durch Hitze	41
4.1.2.2. Denaturierung durch Röntgenstrahlen	46
4.1.2.3. Denaturierung durch DNase I	46
4.1.2.4. Denaturierung von DNA durch Röntgenstrahlen: Viskosimetrischer Nachweis der Veränderungen	46
4.1.2.5. Denaturierung von DNA durch Röntgenstrahlen: Chromatographischer Nachweis der Veränderungen	51
4.2. In vivo-Versuche	54
4.2.1. Untersuchungen an Milz und Thymus	54
4.2.2. Untersuchungen an der Leber	55
4.2.3. Viskosimetrische und säulenchromatographische Untersuchungen	56

	Seite
5.	Diskussion 95
5.1.	In vitro-Versuche 95
5.1.1.	TB-Metachromasie: Spezifität 95
5.1.2.	TB-Metachromasie: Größe, Struktur und Konformation des Polyanions 95
5.1.3.	TB-Metachromasie: Mechanismus 96
5.1.4.	TB-Metachromasie: Empfindlichkeit gegenüber Konformationsänderungen des Polyanions 96
5.1.5.	Reproduzierbarkeit der mithilfe der TB-Metachromasie nachgewiesenen Konformationsänderungen der DNA 102
5.2.	In vivo-Versuche 102
5.2.1.	Zur Methode 102
5.2.2.	Zur Deutung der Befunde 104
5.2.2.1.	Röntgenstrahlen 104
5.2.2.2.	Biologische Alkylentien 106
6.	ZUSAMMENFASSUNG + SUMMARY 109
7.	LITERATURVERZEICHNIS 113
	Lebenslauf

1. PROBLEMSTELLUNG

Nach Zusatz von Desoxyribonucleinsäure (DNA) zeigen wäßrige Lösungen von Toluidinblau negative Metachromasie. Die dabei auftretenden Farbqualitäten hängen nach Art und Umfang unter anderem von der Konformation der DNA-Moleküle ab. Bleiben die Reaktionsbedingungen konstant, lassen sich konformationsändernde Einflüsse *i n v i t r o* somit metachromatisch erfassen.

Im Vergleich mit *i n v i t r o* geschädigter Thymonucleinsäure wurden vorliegend die metachromotropen Eigenschaften von DNA aus Milz, Thymus und Leber der Maus nach Ganzkörper-Röntgenbestrahlung oder einmaliger i.v. Injektion von 2,4,6-Triäthylenimino-1,3,5-triazin untersucht. Mehrere DNA-Proben wurden zusätzlich viskosimetrisch und chromatographisch überprüft.

2. EINLEITUNG

2.1. Bau und Funktion der Nucleinsäuren (l.c. 33, 66, 92, 186)

Nucleinsäuren sind Polynucleotide. Während sich die Desoxyribonucleinsäure (DNA) vorwiegend im Zellkern befindet, läßt sich die Ribonucleinsäure (RNA) vor allem im Protoplasma und im Nucleolus (= Zellkernbestandteil) nachweisen.

Die Nucleinsäuren setzen sich aus einer sauren Komponente, der Orthophosphorsäure, heterozyklischen organischen Basen vom Purin- und Pyrimidintyp und einer Pentose zusammen. Cytosin, Uracil und Thymin sind die wichtigsten Pyrimidin-, Adenin- und Guanin die häufigsten Purinbasen. Während Thymin fast nur als Bestandteil der DNA auftritt, beschränkt sich Uracil im wesentlichen auf die RNA. Der Zuckerbestandteil besteht bei der DNA aus β -D-Desoxyribose, bei der RNA aus β -D-Ribose. Die den einzelnen Basen entsprechenden Nucleoside, Cytidin, Thymidin, Adenosin, Guanosin und Uridin, entstehen bei der Verbindung von Base und Zucker. Dabei kommt es unter Abspaltung eines Moleküls Wasser zu einer N-glykosidischen Bindung zwischen der Aminogruppe der Base und der halbacetalischen Hydroxylgruppe des Zuckers. Verbindet sich Orthophosphorsäure mit dem C-Atom 5 des Nucleosid-Zuckers, entstehen Nucleotide.

Ein vollständiges DNA-Molekül besteht aus einer Doppelspirale von umeinander gewundenen Polynucleotidketten, deren Basensequenz für jede DNA artspezifisch ist. Die Basen liegen im Innern dieser Doppelhelix "senkrecht" zur Helixachse. Zwischen den einzelnen Basen bestehen Wasserstoffbrücken (92), die sich aus sterischen Gründen allerdings nur zwischen Adenin und Thymin (oder Uracil) bzw. Guanin und Cytosin ausbilden können.

Bei der DNA-Synthese werden Teile der Doppelhelix zunächst entspiralisiert. An den entspiralisierten Abschnitten werden

anschließend Nucleosidtriphosphate unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes pro Nucleotid zur komplementären Polynucleotidkette kondensiert. Diese Kondensation wird von dem Enzym DNA-Polymerase bewerkstelligt. Die RNA-Synthese erfolgt analog unter dem Einfluß von RNA-Polymerase an einem der DNA-Stränge als Matrize, wobei sich Uracil anstelle von Thymin mit Adenin paart.

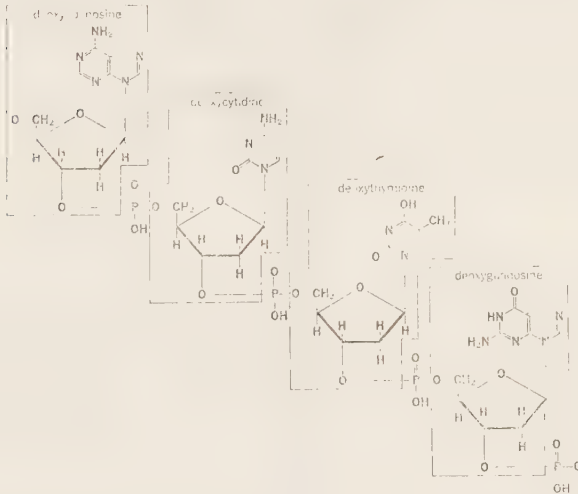


Abb. 1 : Schematische Darstellung eines DNA-Teilstückes mit vier Nucleosiden - nach DEPUY und RINEHART (32)

Das Aufbaumaterial der Chromosomen und Gene besteht ganz oder teilweise aus einem Komplex von DNA und Protein (200). Die DNA ist die molekulare Grundlage der genetischen Information eukaryoter Zellen. Diese Funktion wird bei den meisten Organismen von doppelsträngiger DNA, bei einigen Viren von einsträngiger DNA oder RNA bzw. doppelsträngiger RNA übernommen.



Abb. 2 : Schema der Nucleinsäurebiosynthese
nach KARLSON (86)

Eine weitere wichtige Funktion der Nucleinsäuren liegt in ihrer Beteiligung an der Proteinsynthese. Dabei dient die RNA als Matrice zur Weitergabe der Information (Messenger-RNA). Die Aminosäuren werden an den RNA-haltigen Ribosomen zur Polypeptidkette verknüpft. Die durch Basenpaarung an einem DNA-Strang gebildete Messenger-RNA bestimmt durch ihre Basensequenz die Sequenz der Aminosäuren, die durch kleinmolekulare "Transfer-RNA" an die Ribosomen herangeführt werden. Die Kombination aus drei Basen (Triplet) bildet den Informationsschlüssel für eine Aminosäure.

2.2. Physikalisch-chemische Grundlagen der Wirkung ionisierender Strahlen
(l.c. 1,4, 23, 30, 33, 36, 39, 163, 193, 200, 215)

2.2.1. Strahlenarten

Ionisierende Strahlen entstehen beim Zerfall natürlicher und künstlicher instabiler Isotope oder werden durch elektrische Felder in besonderen Generatoren erzeugt (z.B. Röntgenstrahlen). Man unterscheidet korpuskuläre und kurzweilige, elektromagnetische Strahlung. Zur ersten Gruppe gehören unter anderem Elektronen- (β -Strahlen), Heliumkern- (α -Strahlen), Protonen- (positive Elementarladung der Masse 1) und Neutronen-Strahlen (ohne Ladung mit Masse 1); die zweite Gruppe umfaßt die Röntgen- und γ -Strahlen.

2.2.2. Strahlenabsorption
(l.c. 4, 33, 34, 148, 163)

Die Wirkung ionisierender Strahlen wird durch den im bestrahlten Material absorbierten Energieanteil bestimmt (163). Die Energieabsorption selbst vollzieht sich im atomaren Bereich entweder in einem Einzelprozeß oder in Folgeprozessen (186), wobei die Energie eines Quants oder Teilchens vollständig oder teilweise auf das entsprechende Atom übertragen

wird (4, 83, 148, 165). Dieses Atom wird (abhängig von der Strahlenqualität und -energie, der räumlichen Dimension des Wirkungsaustausches und der Dauer der Wechselwirkung) unter Bildung eines Ionenpaares ionisiert und/oder angeregt. Neutronen übertragen ihre Energie zunächst auf den Atomkern, während die übrigen Strahlenarten bei Energien < 10 MeV vorwiegend mit Hüllenelektronen interferieren. Bei der Strahlenabsorption entstehen somit zunächst instabile, angeregte Moleküle, mit kinetischer Energie versehene "Sekundärstrahlen" und Molekülbruchstücke mit einem unpaarigen Valenzelektron ("Radikationen"). Die nun folgenden Reaktionen hängen unter anderem von der räumlichen Energieverteilung ab.

2.2.3. Verteilung der absorbierten Strahlenenergie
(l.c. 4, 33, 34, 163, 193)

Mithilfe der "Blaskammer" ließ sich zeigen, daß Ionisationsvorgänge auch in flüssigen Medien diskontinuierlich und in statistischer Verteilung erfolgen: In unmittelbarer Nähe einer Quanten- oder Teilchenbahn bilden sich Primäri-ionisationen. Um die Teilchenbahn induzieren Sekundärelektronen "eine Wolke" zufällig verteilter nachgeordneter Ionisationsvorgänge

2.2.4. Direkte Strahlenwirkung - Treffertheorie
(l.c. 4, 34, 148)

Eine biologische Strahlenwirkung wurde zunächst nur unter der Voraussetzung erwartet, daß eine bestimmte Struktur- und Funktionseinheit (etwa ein Nucleinsäuremolekül) unmittelbar von einem Ionisationsereignis betroffen wird. Mathematisch-statistische Überlegungen führten unter anderem zu folgendem Ansatz: Um eine biologische Einheit zu inaktivieren, ist eine bestimmte, mittlere Energiemenge erforderlich. Wird die für eine Strahlendosis im Bereich der LD 50/30 im Gewebe deponierte Energiemenge zur vorhandenen Zellzahl in

Relation gesetzt, so folgt: Die Trefferzahl ist zwar um zwei Größenordnungen größer als die Anzahl der im getroffenen Volumen vorhandenen Zellen, jedoch $10^6 - 10^7$ mal kleiner als die Zahl der im getroffenen Volumen vorhandenen biologischen Funktionseinheiten bzw. Moleküle. Eine einfache Beziehung zwischen Strahlendosis und Absterbeverlauf ist somit vor allem dann zu erwarten, wenn die zu bestrahlende biologische Elementareinheit die Dimension eines Moleküls annimmt. Solche "einfachen" Dosis-Wirkungsbeziehungen $(N_t = N_0 \cdot e^{-\delta \cdot t})^*$ zeigten sich überraschenderweise auch bei Strahlenwirkung auf komplexere biologische Einheiten (wie Gene, Bakterien und Viren), woraus auf einen einzigen Trefferbereich geschlossen werden konnte.

2.2.5. Indirekte Strahlenwirkung - Radikaltheorie
(l.c. 4, 30, 33, 34, 148, 163, 193)

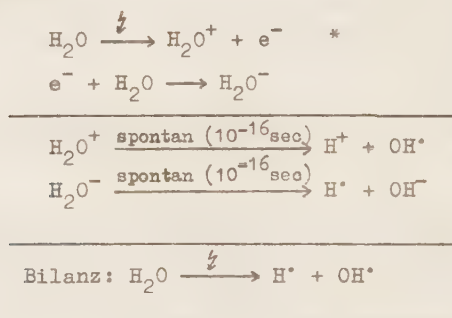
Die Dosis-Wirkungskurven zahlreicher anderer biologischer Objekte (etwa von Säugetierzellen) waren demgegenüber sigmoid. Dieser Befund war nur mit der Annahme vereinbar, daß die Strahlenwirkung erst über mehrere Treffer erreicht wird (4, 34, 148). Die jeweilige Schädigung zeigte überdies biologische Varianz und war durch Dosisleistung und Reaktionsmilieu zu beeinflussen.

Schließlich führte die Ableitung des biologischen Wirkungsvolumens einer Ionisation (v) als Produkt des Ionisationsbereiches γ und der Trefferwahrscheinlichkeit p zu dem Schluß: $v > \gamma$. Als Erklärung für diesen Tatbestand mußte die

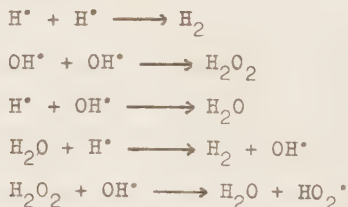
*) N_t = Zahl der nach der Zeit t noch aktiven Einheiten
 N_0 = Zahl der zu Beginn der Bestrahlung aktiven Einheiten
 e = Basis der natürlichen Logarithmen
= Einstrahlungskoeffizient (als Funktion der in der Zeiteinheit absorbierten Strahlenenergie)
 t = Bestrahlungszeit
 δ = Einstrahlungs-Koeffizient

Möglichkeit intermolekularen Energietransfers in Betracht gezogen werden (34, 169). Sie wird als "indirekte Strahlenwirkung" bezeichnet. Ihre Vermittlung vollzieht sich im biologischen Bereich vor allem über Radikale des Wassers. Diese Radikale (Radikal = Molekülbruchstück mit einem unpaarigen Elektron) sind heute ebenso wie die Mechanismen ihrer Bildung bekannt (4, 23, 34, 148, 186).

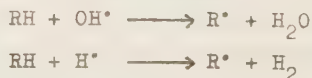
2.2.5.1. Radikale bei Bestrahlung von sauerstofffreiem Wasser



Sekundärreaktionen:

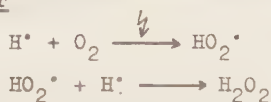


Reaktionsmöglichkeiten der gebildeten Radikale mit organischen Molekülen (RH):



*) γ = Bestrahlung

2.2.5.2. Radikale bei Bestrahlung von sauerstoffhaltigem Wasser

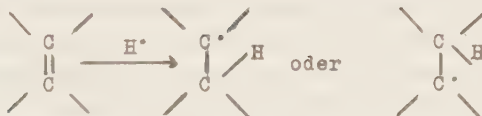


2.2.5.3. Reaktionsmöglichkeiten organischer Radikale in Gegenwart von Sauerstoff

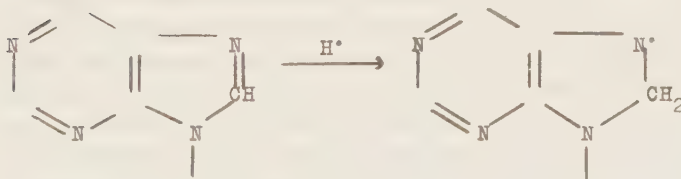


Basenradikale:

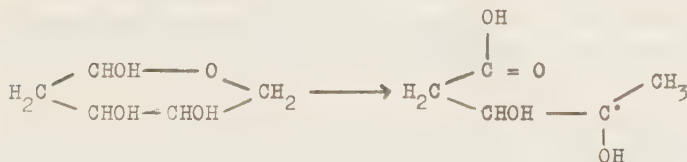
Bei Pyrimidinen:



Bei Purinen:



Zuckerradikal:



2.3. Zur Wirkung von ionisierenden Strahlen auf DNA
(l.c.31, 57, 81, 82, 84, 101, 136, 148, 162, 186,
196, 215, 216)

2.3.1. In vitro
(l.c. 15, 16, 33, 70, 81, 82, 101, 155, 161, 166,
167, 168, 197, 198, 200, 205, 208)

2.3.1.1. Veränderungen an den Basen
(l.c. 33, 101, 161, 166, 167, 168, 197)

Da vermutet wird, daß pro Zelle jeder Informationsgehalt der DNA nur einmal vorhanden ist, kann die strahlenchemische Veränderung einer einzigen Base eines DNA-Stranges bereits zu biologischen Konsequenzen führen (186). Zur Auslösung meßbarer chemischer Veränderungen an den Nucleinsäure-Basen sind allerdings verhältnismäßig hohe Strahlendosen erforderlich (101). LATARJET hat die Strahlenchemie der Pyrimidine ausführlich beschrieben (101). Bei Bestrahlung in wäßriger Lösung kommt es unter anderem zu folgenden Reaktionen: Die OH-Radikale greifen vorwiegend an der 5,6-Doppelbindung an. Dabei entsteht in aerober Lösung Pyrimidin-Hydroxy-Hydroperoxid. Die instabilen Hydroxy-Hydroperoxide von Uracil und Cytosin reagieren zu Glykol bzw. Isobarbitursäure weiter (215). In anaerober Lösung bildet sich über Zwischenreaktionen Glykol. Nach Versuchen von SCHOLES et al. (166-168) reagieren die Pyrimidine bei Bestrahlung fast doppelt so empfindlich wie Purine. Bei den letzteren tritt in aerober Lösung Peroxidation der 5,6-Doppelbindung, in anaerober Lösung eine Zerstörung des Imidizolringes ein. Das Ausmaß der Basenzerstörung nimmt bei Bestrahlung in wäßriger Lösung in folgender Reihenfolge ab: Freie Base > Nucleosid > Nucleotid > DNA (33).

2.3.1.2. Veränderungen am Zucker

(l.c. 198)

Als Folge der Bestrahlung kann es an der Zuckerkomponente der DNA zur hydrolytischen Spaltung der N-Glykosidbindung kommen (166). Nach SCHOLLES et al. entsteht dabei ein Bruch in der Nucleotidkette, wobei 3'- und 5'-Monophosphate entstehen (166). ULLRICH und HAGEN (198) weisen für Strahledosen von 0,4 bis 1,0 Mrad die Bildung von Malondialdehyd im Desoxyribose-Rest nach.

2.3.1.3. Brüche in den Polynucleotidketten

(l.c. 70, 81, 82, 140, 141, 159, 198)

Bei Bestrahlung von DNA kann es zum Auftreten von Einzel- (33) und Doppelstrangbrüchen kommen. Da dadurch das Molekulargewicht beeinflusst wird, können zu ihrem Nachweis Molekulargewichtsbestimmungen herangezogen werden (33). Die Molekülgröße ist jedoch nicht einheitlich, daher wird statt der Zahl der Brüche pro Molekül die Bruchhäufigkeit (bei Einzelbrüchen pro Nucleotid, bei Doppelbrüchen pro Nucleotidpaar) angegeben (33).

Wird trockene DNA röntgenbestrahlt, vergrößert sich die Bruchhäufigkeit linear mit der Dosis. Bestrahlung unter Sauerstoff erhöht die Einzelbruchhäufigkeit deutlich (65), während der Einfluß auf die Doppelbruchhäufigkeit gering ist (64). Bei Bestrahlung wässriger DNA-Lösungen vergrößert sich die Zahl der Einzel- und Doppelstrangbrüche dosisproportional (208).

2.3.1.4. Intermolekulare Vernetzungen

(l.c. 8, 33, 61, 84, 136, 161, 186)

Verschiedene Autoren berichten über strahleninduzierte Vernetzungen zwischen einzelnen Molekülen. Das Ausmaß hängt von mehreren Faktoren (wie Konzentration, Konformation und

Größe der Makromoleküle sowie Ionenstärke des Lösungsmittels) ab (33). In wäßriger Lösung zeigt sich im allgemeinen ein Konzentrationsoptimum für die Erzeugung von Vernetzungen (71). Bei höheren Konzentrationen nimmt die Vernetzungsrate pro Dosiseneinheit ab und gleicht sich dem Wert von trockener bestrahlter DNA an. Bei abnehmender DNA-Konzentration wird die Wahrscheinlichkeit von Vernetzungen ebenfalls geringer, von einer kritischen Konzentration ab treten überhaupt keine Vernetzungen mehr auf (71). Diese kritische Konzentration ist umso kleiner je größer das Molekulargewicht der bestrahlten ist.

2.3.1.5. Zerstörung der Wasserstoffbindungen (l.c. 33, 66, 166, 197)

Neben Brüchen in den Polynucleotidketten und intermolekularen Vernetzungen kommt es am DNA-Molekül durch Bestrahlung auch zu einem Bruch von Wasserstoffbrücken (23). Dabei erhöht sich die optische Absorption in wäßrigen Lösungen im UV-Bereich. Die Extinktionszunahme neutraler und saurer DNA-Lösungen bei 260 nm kann von der gegenläufigen Abnahme der optischen Absorption durch Basenzerstörung unterschieden werden (33, 193, 207).

Bei Bestrahlung mit geringen Dosen werden pro Einzelstrangbruch - Einzelstrangbrüche verursachen den größten Teil der Spaltung von Wasserstoffbrücken - 14 bis 16 Wasserstoffbrücken unterbrochen (143, 166); d.h.: Nach beiden Seiten hin sind je 3 bis 4 Nucleotidpaare nicht mehr über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden (166). Als Erklärung wird unter anderem angenommen, daß nach einem Einzelstrangbruch Wassermoleküle in die Doppelhelix eindringen. Nach SCHOLLES (166) treten diese Wassermoleküle an die Stelle der Wasserstoffbrücken zwischen die Basen, was jedoch nur bis zu einem Grenzwert möglich ist. Nach TEMPERLEY (194) umfaßt der größte so trennbare Abschnitt 15 bis 20 Wasserstoffbindungen.

2.3.1.6. Beteiligter Mechanismus - Radikale (l.c. 15, 31, 33, 198)

An bestimmten Teilen des Moleküls bilden sich strahleninduzierte freie Radikale (31, 129, 215). Diese rufen an dem DNA-Molekül chemische Veränderungen wie Desaminierung oder Dehydroxylierung, Bruch der Basen-Zucker-Bindung, Oxidation des Zuckers oder Freisetzung von Phosphatgruppen hervor (15, 198). Dadurch erfährt schließlich die DNA-Struktur eine Veränderung.

Die Radikalausbeute wächst in der Reihenfolge: Base < Nucleosid < Nucleotid (128), während das Ausmaß der Basenzerstörung in obiger Reihenfolge abnimmt (s. Teil 2.3.1.1.). Bei den Basenradikalen handelt es sich ausschließlich um Wasserstoff-Anlagerungsradikale. Die Anlagerung erfolgt bei den Pyrimidinen (s. Schema in Teil 2.2.5.) vorwiegend an der 5,6-Doppelbindung, bei den Purinen insbesondere an den Positionen 2 oder 8. Die Desoxyribose wandelt sich durch Wasserstoff-Abspaltung (indirekte Strahlenwirkung) und Ringöffnung in das Radikal um. Die abgespaltenen Wasserstoffatome greifen die Nucleoside und Nucleotide an, womit sich die oben erwähnte größere Radikalausbeute bei Nucleosiden und Nucleotiden erklären läßt (33). BLOK und VERHEY (15) folgern aus ihren Versuchen, daß die DNA in konzentrierten Lösungen zu 95% durch OH-Radikale und bei Konzentrationen von wenigen µg/ml vor allem durch reduzierende Radikale inaktiviert wird.

2.3.1.7. Quantitative Aspekte (l.c. 161)

Strahlenbedingte Veränderungen an der DNA werden unter anderem an DNA-Viren, zum Beispiel an bestimmten Bakteriophagen untersucht, da ihre DNA verhältnismäßig einfach und schonend isoliert werden kann (186). Aus der Vielzahl einschlägiger Publikationen seien hier nur die jüngst publizierten, besonders aufschlußreichen Untersuchungen von SCHANS et al. (161)

zitiert: PM2- Bakteriophagen wurden in O₂-haltiger Lösung den Gamma- Strahlen (7 rad/sec) eines ⁶⁰Co-Präparates ausgesetzt. Der Vergleich der biologischen Aktivität von a) bestrahlten, im übrigen aber unbehandelt gebliebenen DNA-Proben, b) Präparationen nach schonend durchgeführter Denaturierung (Inaktivierung von Molekülen mit Einzelstrangbrüchen) und c) Präparaten nach Inaktivierung von DNA-Molekülen mit Einzel- und Doppelstrangbrüchen führte zu dem Schluß, daß 4,5% der Inaktivierung auf Doppel-, 8,5% auf Einzelstrangbrüche und 87,0% auf Nucleotidschäden beruhen.

2.3.1.8. Starter-Aktivität der DNA gegenüber der DNA- und RNA-Polymerase-Reaktion
(l.c. 56, 68, 69, 157)

Hinsichtlich ihrer Starter-Aktivität gegenüber der RNA-Polymerase-Reaktion erweisen sich sowohl isolierte DNA (217) als auch Nucleohiston-Präparationen (200) als vergleichsweise strahlenunempfindlich. Meßbare Inaktivierungsquoten werden im allgemeinen erst durch Absorption von einigen Tausend bis Zehntausend Rad erreicht (200, 217). Das von WALWICK et al. (205) untersuchte in vitro-System zur Synthese der DNA wurde selbst durch Strahlendosen von 10.000 Rad nicht signifikant beeinflusst.

Zur Inaktivierung von Phagen-DNA genügen allerdings schon wenige Hundert bis Tausend Rad (161).

2.3.2. In vivo
(l.c. 63, 64, 75, 180, 188, 195)

Werden Säugetiere hochdosierte ganzkörper-röntgenbestrahlt, kommt es vor allem in primär strahlenempfindlichen Organen wie Milz oder Thymus zu DNA-Abbau (63). Dieser Abbau läßt sich mit chemischen, biochemischen und physikalischen Methoden nachweisen. Zu letzteren gehören unter anderem Verfahren der Viskosimetrie, Chromatographie und Sedimentationsanalyse.

2.3.2.1. Viskosimetrischer Nachweis

Als Beispiel sei auf Untersuchungen aus dem Arbeitskreis von HAGEN (61, 62, 63) und von JANIK (79) verwiesen: Werden Ratten oder Mäuse mit einigen Hundert bis Tausend R ganzkörperbestrahlt, vermindert sich nach einer dosisunabhängigen Latenzzeit von 2-4 Stunden die Viskosität der Thymus-DNA. Dosisabhängig verhält sich der Umfang des Viskositätsabfalls. Unter identischen Versuchsbedingungen zeigte die DNA des Knochenmarks Viskositätsverlust nur nach Dosen im Bereich von einigen Tausend R.

2.3.2.2. Chromatographischer Nachweis

(l.c. 8, 79)

Werden die einige Stunden nach Ganzkörperbestrahlung von Ratte oder Maus aus Milz oder Thymus isolierten DNA-Proben säulenchromatographisch untersucht, verweist das daraus resultierende Eluierungsmuster gleichfalls auf Abbauvorgänge (8, 79, 125). Als Adsorbentien für die DNA dienten unter anderem "ECTEOLA-Cellulose"[®], Methyl-Albumin-Kieselguhr (79) oder Sephadex G-200[®] (125).

2.3.2.3. Nachweis mithilfe der Sedimentationsanalyse

(l.c. 8, 64)

Selbst Strahlendosen in der Größenordnung von einigen Tausend R blieben in Versuchen von HAGEN et al. (64) sogar an Thymus-DNA unerkannt. Zu einer (dosisabhängigen) Änderung des Sedimentationsdiagramms im Sinne von DNA-Abbau kam es erst nach einer mehrstündigen Latenzzeit. Zu vergleichbaren Ergebnissen führten die Sedimentationsanalysen von BAUER (8) an DNA-Präparaten aus Milz oder Thymus von Ratten nach Ganzkörperbestrahlung mit 1000 R. Stammten die DNA-Proben aus "strahlenresistenteren" Organen (hier: Niere), traten keine sedimentationsanalytisch faßbaren Veränderungen auf.

Die aus diesen Versuchen ableitbaren Aussagen hinsichtlich des Auftretens primärer Strahlenschäden an der DNA bedürfen allerdings einer Überprüfung durch empfindlichere Sedimentationsanalysen, etwa die Sedimentation mithilfe der Zentrifugation im alkalisierten Saccharose-Gradienten (141).

2.3.2.4. Zur Bedeutung der Befunde für die DNA-Funktion (l.c. 33, 49, 68, 73, 75, 186)

Die meisten Untersucher stimmen hinsichtlich der Feststellung überein, daß die Neubildung der RNA (einschließlich der mRNA) wesentlich strahlenresistenter ist als die DNA-Synthese (33, 51, 136, 157, 186, 189, 193). Zu den Ursachen gehört u.a. die Schädigung der Matrizenaktivität der DNA (33, 51, 64, 68, 81, 82, 136, 186, 200). Der von DERTINGER und JUNG (33) zunächst gezogene Schluß, wonach Basenschäden die kritischen Läsionen bei der Strahleninaktivierung der DNA-Matrizen-Funktionen seien, blieb allerdings nicht unwidersprochen (81, 82 und 2.3.1.7.). Eine mögliche Deutung der beobachteten unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit von DNA- und RNA-Synthese wurde u.a. von STREFFER (186) vorgeschlagen: "Für die DNS-Synthese wird die Funktionsfähigkeit des gesamten Genoms benötigt. Dagegen wird für die Bildung der mRNS eines bestimmten Enzymes die DNS nur in einem begrenzten Bereich "abgelesen", nämlich lediglich in dem Genort, der die Information für das betreffende Enzym enthält. Damit wäre die Wahrscheinlichkeit, daß die Matrizenfunktion für die DNS-Synthese geschädigt ist, wesentlich erhöht gegenüber der Möglichkeit, daß die Bildung der mRNS erniedrigt wird."

2.4. Physikalische-chemische Grundlagen der Wirkung von Radiomimetika (l.c. 1, 2, 39, 40, 42, 95, 110, 111, 134, 153, 164, 203, 206, 209)

Radiomimetika sind chemische Verbindungen, die ähnliche Endwirkungen am biologischen Objekt besitzen wie ionisierende Strahlen (35). Sie wirken auf den Ruhekern mutagen und karzinogen, hemmen die Mitose und erzeugen echte Chromosomenbrüche (4).

COLER (94) schränkt den Begriff im wesentlichen auf Schwefel- und Stickstofflost-Derivate, Äthylenimine, Epoxide und Methansulfonsäureester ein. Der im anglo-amerikanischen Schrifttum gebrauchte Begriff "biological alkylating

agents" umfaßt alle Verbindungen, die in einem anderen Molekül ein Wasserstoffatom durch ein Alkylradikal ersetzen können (153). Biologische Alkylantien enthalten in ihrem Molekül Atome bzw. Atomgruppen mit infolge ihrer atomaren Struktur hoher Elektronenaffinität und daher hoher Elektronendichte. Solche Verbindungen dissoziieren in wäßrigem Milieu unter Bildung eines Alkylradikals und eines anionischen Restes. Das instabile ("elektrophile") Alkylradikal "versucht", in einen stabilen Zustand überzugehen, indem es mit elektronenreichen ("nucleophilen") Zentren reagiert.



Die Alkylierung beruht auf der sehr leicht erfolgenden Öffnung des "gespannten" Äthyleniminoringes, wobei biologische Bausteine oder Enzyme mit leicht beweglichen Wasserstoffatomen ($R' - H$) im Sinne des Schemas alkyliert und damit denaturiert werden können.

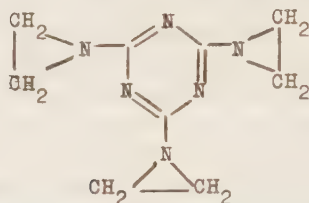
Es hat sich gezeigt, daß es in vitro keine verbindliche, die biologische Wirkung der Radiomimetika erklärende Spezifität gegenüber Reaktionspartnern gibt (153). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von Art und Konzentration der Reaktionspartner sowie vom Reaktionsmilieu. Ihre Wirkung auf das biologische Objekt wird außerdem durch alle Faktoren beeinflusst, welche die Konzentration der wirksamen Verbindungen am Wirkungsort bestimmen.

Bei Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Radiomimetika am biologischen Objekt wurde festgestellt, daß der Besitz einer oder mehrerer "funktioneller Gruppen" (z.B. S- und N-Chloräthylamin-, Äthylenimin-, Epoxid- und Mesyloxygruppen) entscheidend ist. Verbindungen mit zwei oder mehreren solcher Gruppen sind dabei um ein Mehrfaches wirksamer als Verbindungen mit nur einer funktionellen Gruppe (193).

Funktionelle Gruppen einiger Radiomimetika (203):

- Chloräthylamin -	- $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$
Mesyloxy -	- OSO_2CH_3
Epoxid -	- $\text{CH} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array} \text{CH}_2$
Äthylenimino -	- $\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \end{array}$

z.B. in TEM



2.5. Zur Wirkung von Radiomimetika auf DNA
(l.c. 1, 6, 11, 20, 21, 23, 37, 54, 83, 104, 119, 132, 179, 190, 191, 193)

2.5.1. In vitro
(l.c. 91, 103, 120)

Nucleinsäuren können durch Radiomimetika in vitro (1, 4, 23, 32, 40, 42, 83, 91, 96, 105, 106, 112, 164, 182, 193, 205, 209) und in vivo (11, 29, 55, 91, 135, 211) durch miteinander vergleichbare und relativ geringe Substanzkonzentrationen (z.B. in vivo: 4,8 mg/kg K.-Gew. von Bayer E 39 (135)) meßbar alkyliert werden. Am DNA-Molekül richtet sich der bevorzugte Reaktionsort nach Art der radiomimetisch wirksamen Ver-

bindung. So greifen Stickstofflost-Derivate vorwiegend am N-7 im Guanin (11, 28, 55, 91, 135, 211), N-3 und N-1 im Adenin und N-1 im Cytosin (105), außerdem an den Phosphatgruppen der Nucleinsäuren, Trenimon[®] dagegen vor allem am Cytidinanteil der DNA an (74).

Die angegriffenen Makromoleküle werden sowohl strukturell als auch funktionell verändert. Der dabei unter anderem gemessene Viskositätsabfall kann sowohl durch Moleküldeformation (Änderung der Sekundärstruktur) über inter- und intramolekulare Vernetzungs- und Entladungseffekte an den Phosphatgruppen (23, 193), als auch durch Zerfall des alkylierten Nucleinsäurestranges zustande kommen (193). Zu den daraus resultierenden Funktionseinbußen gehört unter anderem die Einschränkung der Matrizenaktivität gegenüber der DNA- und RNA-Polymerase-Reaktion (106). Erstere reagiert dabei offenbar empfindlicher.

Wie bereits erwähnt, sind Radiomimetika mit zwei oder mehreren "funktionellen Gruppen" biologisch wirksamer als monofunktionelle Verbindungen. Letztere können begreiflicherweise keine Vernetzungseffekte auslösen (20, 50, 93, 107, 190). Ob dies jedoch den skizzierten Wirkungsunterschied der Verbindungstypen qualitativ und quantitativ erklärt, ist bislang nicht eindeutig zu entscheiden

2.5.2. In vivo

(l.c. 1, 6, 11, 43, 55, 60, 73, 74, 83, 98, 112, 113, 114, 115, 126, 147, 154, 187, 202)

Zu den wesentlichsten biologischen Wirkungen von radiomimetisch wirksamen Verbindungen gehört die Hemmung von Zellteilung und DNA-Synthese (60, 116, 156). RNA- und Proteinsynthese werden im allgemeinen erst durch höhere Dosen beein-

fließt (60, 147). Werden biologische Alkylantien ausreichend hoch dosiert, lassen sich auch unter In vivo-Bedingungen Alkylierungsvorgänge an der DNA nachweisen (1, 6, 29).

Ihre Bedeutung für die Funktion der DNA ist nach wie vor umstritten, da sich die (gelegentlich um Größenordnungen geringeren) mitosehemmenden Konzentrationen in vielen Fällen dem Nachweis an der DNA entziehen (110). Beispielsweise zeigten sich nach Behandlung von Ehrlich-Ascites-Zellen tragenden Mäusen mit 3,0 mg HN₂/kg hinsichtlich Schmelzverhalten, optischer Eigenschaften, Viskosität und Sedimentation isolierter DNA-Proben keine Unterschiede zwischen behandelten und Kontrolltieren (55). In anderen Versuchen hatte sich demgegenüber das Stickstoff-Phosphor-Verhältnis der DNA aus Leber und Jensen-Sarkom-Zellen von Ratten nach Behandlung mit Bayer E 39 gegenüber der Vergleichsnorm vermindert (135).

2.6. Zum Wirkungsmechanismus von Actinomycin D
(l.c. 53, 54, 142)

Actinomycine enthalten als wirksame Gruppe (Chromophor) einen Phenoxazonring und zwei lactonartig gebundene Pentapeptide.

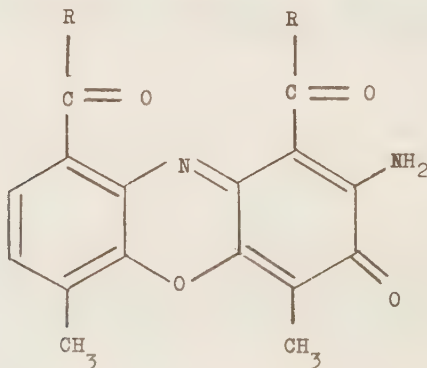
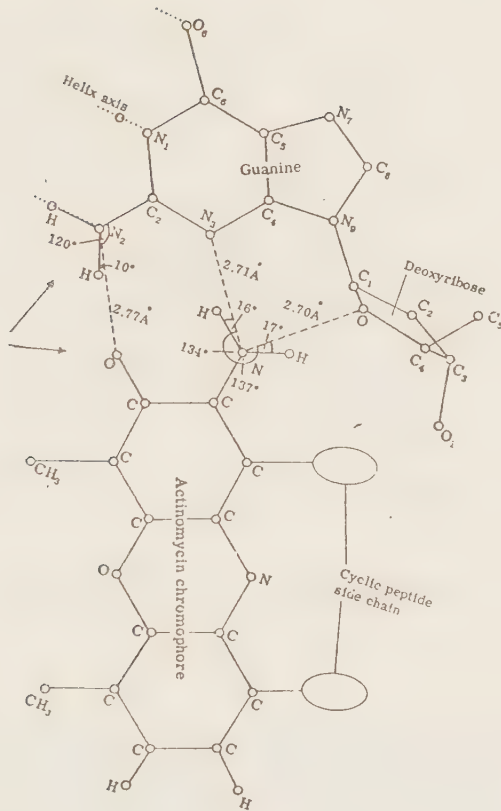


Abb. 3 : Chromophorer Strukturkern der Actinomycine - nach PARTHIER (142)



- Abb. 4 : Vorstellung der Bindungsweise von Actinomycin an das Desoxyguanosin der DNA. Die gestrichelten Linien deuten die Ausbildung von Wasserstoffbrücken an - nach PARTHIER (142)

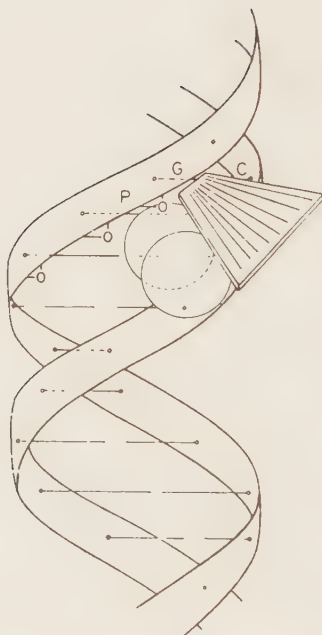


Abb. 5 : Schematische Darstellung der sterischen
Verhältnisse bei der Bindung von Actinomycin
an die DNA-Doppelhelix. Das trapezförmige
Gebilde symbolisiert den Phenoxazinkern, die
Kreise stehen für die Peptidlactone des
Hemmstoffmoleküls - nach PARTHIER (142)

Den geltenden Anschauungen zufolge (49, 53, 54, 89, 130, 132, 142) verbinden sich Actinomycine stereospezifisch mit der DNA. Dabei wird die NH_2 -Gruppe des Chromophors durch je eine Wasserstoffbrücke am N-3 des Guanins und am Sauerstoff der Desoxyribose verankert, während die NH_2 -Gruppe des Purinkerns in 2-Stellung eine weitere Wasserstoffbrücke zum Chinon-Sauerstoff der Actinomycine ausbildet (s. Formelschema).

Sterische Gegebenheiten bedingen, daß sich Actinomycin in die "schmale Furche" der DNA einordnet (s. Schema). In der schmalen Helixfurche der DNA ist auch die RNA-Polymerase lokalisiert. Als Folge der Bindung von Actinomycin an die DNA tritt somit eine Blockierung der Matrizenfunktion und die Verdrängung des Enzyms vom Wirkungsort ein.

Da sich die DNA-Polymerase der breiten Helixfurche bedient, wird der Vorgang der DNA-Verdoppelung primär nicht beeinflusst (49, 53, 54, 89, 130, 132, 142).

2.7. Zur Metachromasie von Toluidinblau (TB) an Polyanionen

(l.c. 24, 27, 41, 44, 76, 77, 78, 87, 88, 100, 117, 122, 127, 139, 144, 145, 149, 183, 213)

Viele Farbstoffe reagieren mit Polymeren (wie Proteinen und Nucleinsäuren) zu Komplexverbindungen. Bei diesen Farbstoffen handelt es sich zumeist um Kationen. Werden sie mit den anionischen Makromolekülen wäßrig gelöst, kann es zu molekularen Wechselwirkungen kommen (polare Wechselwirkungen, Van der Waals-Kräfte u.a.m.). Der Farbstoff verhält sich "wie ein Polymer" und zeigt (negative und positive) Metachromasie.

Die metachromatische Reaktion hängt nach Art und Intensität von der Art und molekularen Struktur der Reaktionspartner, dem Reaktionsmilieu sowie dem Konzentrationsverhältnis Farbstoff/Polyanion ab. So kann sich die DNA-Sekundärstruktur durch Anlagerung bivalenter Kationen ändern (199, 201). Sie tritt als Stabilisierung der Sekundärstruktur der DNA auf und erhöht die Schmelztemperatur. Die Bindungsmechanismen der

verschiedenen, stabilisierenden Kationen sind unterschiedlich. Bei metallischen Kationen z.B. wird sie über Bindungen mit den DNA-Phosphatgruppen erklärt, bei Acridinen dagegen über Wechselwirkungen mit DNA-Basen (90). Die Bindung von Farbstoffen an thermisch denaturierte DNA ist von der Art des Farbstoffes, dessen Konzentration und den Denaturierungsbedingungen abhängig (117). Die Farbstoff-DNA-Bindung erfolgt abhängig von der Ionenstärke des Lösungsmittels. Bei Änderung des pH-Wertes kann es sowohl zur Änderung des Bindungsverhaltens der Farbstoffe als auch zu Änderungen der DNA-Sekundärstruktur kommen. Bei $\text{pH} < 3$ z.B. tritt Säuredenaturierung der DNA ein. Ändern sich bei konstantem Reaktionsmilieu die metachromotropen Eigenschaften eines Polyanions, in diesem Fall der DNA, so ist dies als Ausdruck von Änderungen seiner Molekülstruktur zu werten (18).

Je nach der chemischen Struktur des Farbstoffes kommt es zur unterschiedlichen Bindung an die Polyanionen. Die elektrostatische Bindung von Farbstoffkationen mit DNA-Phosphatgruppen kann so geschehen, daß sich die gebundenen Substanzen entweder außer- oder innerhalb des DNA-Doppelstranges befinden. Die vorliegende Bindungsart ist spezifisch abhängig von der Farbstoffart, den ionalen und Lösungsmittelbedingungen und dem Verhältnis Farbstoff zu DNA-Phosphat. Als Lösungsmittel für metachromotrope Reaktionen ist Aqua dest. unter anderem deshalb geeignet, weil es die Dissoziation anionischer und kationischer Gruppen erlaubt (18). Da die Doppelhelix in Aqua dest. weitgehend zerfällt (Bruch der Wasserstoffbrücken), ist ihre bei 555 nm meßbare metachromotrope Aktivität gegenüber TB gering (192). Zu Strukturen höherer Ordnung führt offenbar die Lösung von hochmolekularer DNA in wäßrigen Proteinlösungen. Ihre bei 555 nm gemessene metachromotrope Aktivität ist dann so intensiv, daß strukturbedingte Aktivitätsänderungen in vitro verhältnismäßig empfindlich und mit einem hohen Grad an Reproduzierbarkeit erfaßt werden können (192).

Tab. A : Zur Wirkung von ionisierenden Strahlen auf die DNA.
Übersicht nach OKADA (36) (modifiziert).

Präparate	Dosis	Untersuchungen	Veränderungen ^a
*Milz und Thymus	750 R	DNA-Gehalt	keine
*Milz	810-850 R	Desoxyribonucleo- tidspiegel	keine
*Milz und Thymus	750 R	Desoxyribonucleo- tidspiegel	keine
**Thymus	1000 R	Viskosimetrie	keine
*Leber	1000 R	Viskosimetrie	keine
*Thymus	1000 R	Viskosimetrie	keine
*Leber (Regen.)	800 R	Hyperchromischer Effekt	keine
*Thymus	1000 R	Hyperchromischer Effekt mit HCHO	keine
	1000 R	Hyperchromischer Effekt mit Hitze	keine
*Thymus	1000 R	Hyperchromischer Effekt	keine
	1000 R	N/P Verhältnis	keine
	1000 R	ECTEOL-Cellulose- Säulen Fraktion	Zunahme in ei- nem Fraktion
*Thymus	1000 R	ECTEOL-Cellulose- Säulen Fraktion	keine
*Leber (Regen.)	800 R	"Primer-Aktivität"	keine
E. coli	60,000 R	DNA-Gehalt	keine
H. influenza	24,000 R	DNA-Gehalt	keine
E. coli	10,000 R	Elektronische - Doppelbrechung	keine
E. coli	4000 R	Viskosimetrie	Abnahme
Ehrlich-Ascites			
Tumor	1200 R	Viskosimetrie	Abnahme
***Knochenmark	2500 R	Viskosimetrie	Abnahme
E. coli	60,000 R	Sedimentation	keine
E. coli B/r	110,000 R	Sedimentation	Abnahme
	110,000 R	Viskosimetrie	Abnahme
Maus Leukemie L5178Y	110,000 R	Viskosimetrie	Abnahme
Enterococcus stei	60,000 R	Thymine-Dimere im Hydrolysat	keine
	60,000 R	Formaldehyde im Hydrolysat	Zunahme
	60,000 R	Thymine im Hydrolysat	Abnahme
Maus Leukemie L5178Y	1000 R	"Primer-Aktivität"	Abnahme
D. pneumoniae	400,000 R	Transformierende Aktivität	Abnahme
H. influenza	160,000 R	Transformierende Aktivität	Abnahme
E. coli	1000 - 10,000 R	Rekombination	Abnahme

*) Ratte **) Kalb ***) Huhn

a) unmittelbar nach Bestrahlung

3. M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

3.1. Reagentien und Tiermaterial

3.1.1. Reagentien

1. Acetaldehyd, zur Synthese, MERCK, Nr. 9056581.
2. Actinomycin D, krist., rein, SERVA, Nr. 10710.
3. Aethanol, 96%ig, mit Petroläther vergällt,
Fa. HEMMETER, München.
4. Albumin, aus Eiern, RIEDEL-DE-HAEN AG., Hannover,
Nr. 1337.
5. Amylalkohol, p.a., MERCK, Nr. 975.
6. Chloroform, DAB 7, MERCK, Nr. 2431.
7. Desoxyribonuclease I, lyophil., rein, aus Rinder-
pankreas, 450 E/mg, SCHUCHARDT, München, Nr. DE 066.
8. Desoxyribonucleinsäure, Na-Salz aus Kalbsthymus,
hochmol., mindestens 95% DNA, MG 8900000,
N ca. 14,5%, P ca. 8%, EGA-Chemie KG, Steinheim.
9. Diaethylaminoethylcellulose-TLC (DEAE-Cellulose-
Ionenaustauscher) für Dünnschichtchromatographie,
SERVA, Heidelberg, Nr. 45060.
10. Diphenylamin, MERCK, Nr. 3086.
11. Essigsäure, 99-100% (Dichte etwa 1,05), p.a.,
MERCK, Nr. 90063.
12. Kaliumacetat, reinst, MERCK, Nr. 4820.
13. Kaliumjodid, p.a., MERCK, Nr. 5043.
14. Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, p.a., MERCK, Nr. 2790.
15. Natriumchlorid, krist., p.a., MERCK, Nr. 6404.
16. Natriumcitrat, neutral, Dihydrat, p.a.,
MERCK, Nr. 6448.
17. Natriumdesoxycholat, MERCK, Nr. 6504.
18. Natronlauge, Titrisol[®], 0,1 N, MERCK, Nr. 9959.
19. Saccharose, reinst, krist, rechtsdrehend in Wasser,
Rohrzucker, SCHUCHARDT, Nr. 142.
20. Schwefelsäure, 95-97%, (D etwa 1,84),
p.a., MERCK, Nr. 731.
21. Seignettesalz, K-Na-Tartrat, p.a., MERCK, Nr. 8087.

22. 2,4,6,-Triäthylenimino-1,3,5,-triazin⁺⁺, Triethylene
melamine substance (TEM), LEDERLE LABORATORIES
DIVISION, New York, Nr. 2705 J 7539.
23. Trichloressigsäure (TCE), p.a., MERCK, Nr. 807.
24. Toluidinblau O, MERCK, Nr. 1273.

3.1.2. Tiermaterial

Die Untersuchungen erfolgten an ca. 230, 18-23 g schweren männlichen Albinomäusen aus institutseigener Zucht.

3.1.3. Fütterung der Versuchstiere

Die Mäuse wurden vor und während der Versuche mit ALTROMIN[®] (Altrogge-Kraftfutter GmbH, Lage/Lippe) gefüttert. Futter und Wasser waren ad libitum verfügbar.

3.1.4. Behandlung der Tiere

3.1.4.1. Bestrahlung

Die Ganzkörperbestrahlung (GKB) von jeweils 4-8 Mäusen erfolgte in einem oben offenen, zylindrischen Glasgefäß (Durchmesser 20 cm) mit dem Kristalloflex 4 der Firma SIEMENS und HALSKE.

Technische Daten :

Röhrenspannung	55 KV
Stromstärke	30 mA
HWS (Halbwertschicht)	0,16 mm Cu
Filterung	0,16 mm Cu
Abstand Fokus-Objekt	20 cm
Oberflächendosisleistung	51 R/min, davon wurden 17 R/min von Tierkörper absorbiert.

Die Dauer der Bestrahlung richtete sich nach der Fragestellung und betrug 7,5 - 200 min.

3.1.4.2. Applikation von Triäthylenmelamin[®] (TEM)

TEM wurde in Dosen von 2,5-80 mg/kg Körpergewicht (K.-Gew.) (3.1.1.22.) in physiologischer Kochsalzlösung (3.1.1.15.) gelöst i.v. injiziert. Die Lösung wurde stets kurz vor der Injektion frisch hergestellt. Kontrollen erhielten physiologische Kochsalzlösung i.v.

3.1.4.3. Applikation von Actinomycin D

Actinomycin D wurde in Dosen von 0,6 und 1,2 mg/kg K.-Gew. gleichfalls i.v. injiziert. Als Kontrolle diente eine Gruppe von Mäusen, welchen physiologische Kochsalzlösung i.v. injiziert worden war.

3.1.5. Haltung der Tiere während der Versuche

Die bestrahlten sowie die mit Actinomycin D und TEM behandelten Tiere nebst Kontrollen wurden in Makrolon-käfigen (37x21x15) bei Zimmertemperatur gehalten.

3.1.6. Aufarbeitung der Tiere

Vor Aufarbeitung wurden die Mäuse gewogen und anschließend in oberflächlicher Chloroform - Narkose (3.1.1.6.) dekapitiert. Unmittelbar nach der Ausblutung wurden Leber, Milz und Thymus entnommen.

3.1.7. DNA - Isolierung

3.1.7.1. Lösungen

Albumin (3.1.1.4.): 20 mg %ig in dest. Wasser

Äthanol (3.1.1.3.): 96 %ig

Chloroform-Amylalkohol-Mischung (3.1.1.6. bzw. 3.1.1.5.):
10:1 (V/V)

NaCl (3.1.1.15.): 2M in 0,05M wäßriger Na-Citrat (3.1.1.16.)
Lösung

Homogenisationsmedium: bestehend aus :

a) NaCl (3.1.1.15.) 0,1M

b) Na-Citrat (3.1.1.16.) 0,05M

c) Natriumdesoxycholat (3.1.1.17.) 4%ig

3.1.7.2. Verarbeitung der Organe

Nach Entnahme aus dem Tierkörper wurden die Organe eingefroren und 48 Std lang bei -15°C aufbewahrt. Der sich anschließende Vorgang des Auftauens erfolgte bei 4°C und dauerte etwa 30 min. Anschließend wurden die Organe gewogen. Die Leber wurde allein, die Milz zusammen mit dem Thymus weiter verarbeitet.

3.1.7.3. Homogenisation

Die nun folgende Homogenisation der Organe dauerte 2 Minuten und wurde nach POTTER-ELVEHJEM (Homogenisator Potter S der Fa. B. BRAUN, Apparatebau, Melsungen) durchgeführt.

Das Homogenisationsmedium wurde eisgekühlt in Mengen von 6,0 ml/1,0 g Organ-Frischgewicht verwendet. Der Homogenisationsvorgang selbst erfolgte unter Verwendung von Teflonkolben (V_2A -Stahlkolbenstange), passend zu 15 ml- (Leber) bzw. 5 ml Glasgefäßen (Milz und Thymus) und umfaßte 4maliges Auf- und Abbewegen des Kolbens bei 750 U/min.

3.1.7.4. DNA - Extraktion

Das gem. 3.1.7.3. gewonnene Organhomogenat wurde anschließend in der Kühlzentrifuge (Typ Universal Junior III KS der Fa. CHRIST) 15 min. bei 4000 U/min zentrifugiert. Die dabei sedimentierende Zellkernfraktion wurde mit der unter 3.1.7.1. angegebenen Lösung 2-4 mal nachgewaschen und anschließend in 14 ml citrat-haltiger 2M NaCl-Lösung unter sorgfältiger Kühlung rehomogenisiert. Zur Abtrennung des Proteinanteils wurden die wässrigen DNA-Extrakte 7 mal (Milz und Thymus) bzw. 12 mal (Leber) gegen das gleiche Volumen einer Chloroform-Amylalkoholmischung (3.1.7.1.) ausgeschüttelt. Das jeweilige

Schüttelgemisch wurde 15 min bei 4000 U/min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Proteinschicht erschien als Zwischenschicht zwischen dem wässrigen DNA-Extrakt (Überstand) und der Chloroform-Amylalkoholschicht (unterste Schicht). Gelegentlich (insbesondere im Falle der Zellkernreichen Organe Milz und Thymus) wurde die Zellkernfraktionierung umgangen und die Organe unmittelbar in citrathaltiger 2M NaCl Lösung homogenisiert. Das jeweilige Volumen des Homogenates (1/6, G/V) wurde mit citrathaltiger, 2M NaCl-Lösung auf 14,0 ml ergänzt und anschließend in der gleichen Weise wie bereits angegeben enteiweißt. Der nach der letzten Lösungsmittelfraktionierung erhaltene Überstand wurde mit dem doppelten Volumen kalten, 96%igen Äthanol versetzt und solange geschüttelt (ca. 30 min), bis die unmittelbar nach Mischung aufgetretene Trübung verschwunden war. Die DNA war als weißes, faseriges Material kenntlich. Sie wurde mit einem Glasstab aufgenommen, durch pressen gegen den Rand des Zentrifugenglases von Lösungsmittelresten befreit und anschließend erneut entweder in dest. Wasser (zur Viskosimetrie oder Chromatographie) oder in einer 20 mg %igen Albuminlösung (zur Erfassung ihrer metachromotropen Eigenschaften) gelöst.

3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

3.2.1. Prinzip

Die Proteinkonzentration wurde mit der von BÜCHER et al. vereinfachten Biuretmethode gemessen (10). Bei Zusatz von Kupfersulfat zu einer alkalischen Polypeptidlösung entsteht Biuret aus 2 Molekülen Harnstoff unter Abgabe von einem Molekül Ammoniak. Die dabei auftretende violette Farbe hat ihr Extinktionsmaximum bei 546nm. Die Extinktionsdifferenz zwischen proteinhaltigem Reaktionsgemisch und proteinfreiem Reagentienleerwert ist der Proteinkonzentration proportional.

Der Umrechnungsfaktor Extinktionsdifferenz $\longrightarrow$ Proteinkonzentration ist in gewissem Umfang von der Proteinkonzentration abhängig (133).

3.2.2. Lösungen

Biuret - Reagens :

9 g Seignettesalz wurden in ca. 400 ml 0,2 N NaOH gelöst. Der Lösung wurden nacheinander 3,0 g feingepulvertes Kupfersulfat und 5,0 g Kaliumjodid zugesetzt. Dabei mußte jedes Salz vor Zugabe des nächsten vollständig gelöst sein. Anschließend wurde das Lösungsvolumen mit 0,2 N NaOH auf 1000 ml ergänzt.

6%ige Trichloressigsäure (3.1.1.23.)

10%ige äthanolische Lösung von Kaliumacetat (3.1.1.12.)

3.2.3. Ausführung

Die wässrige proteinhaltige Lösung und das Biuret - Reagens wurden zu gleichen Teilen miteinander gemischt und nach 30 min in 2,0 cm Glasküvetten bei 546 nm photometriert. Der Reagentienleerwert bestand entsprechend zu gleichen Teilen aus dest. Wasser und Biuret - Reagens. Die Differenz ist dem Proteingehalt proportional.

3.2.4. Berechnung der Proteinkonzentration

Die Berechnung der Proteinkonzentration der wäbrig gelösten DNA - Präparate erfolgte unter Berücksichtigung eines Albumin Vergleichsstandards (20mg%). Letzterer erbrachte unter den genannten Bedingungen eine Durchschnittsextinktion von $0,105 \pm 0,010/1,0$ mg Protein. ($n=16$)

3.3. Messung der Konzentration von DNA

3.3.1. Prinzip (165)

Die Nucleinsäuren aus dem Organhomogenat werden mit kalter 6%iger TCE gefällt. Im Überstand verbleiben u.a. die nicht fällbaren DNA-Bestandteile. Aus dem Sediment werden die Nucleinsäuren durch 15 min Erhitzen auf 90°C in 10%iger TCE extrahiert und colorimetrisch differenziert.

3.3.2. Lösungen

Acetaldehyd (3.1.1.1.) 1.6 g%ige Lösung

Diphenylamin-Reagens (DISCHE-Reagens) : 100 ml einer 1,5%igen Lösung von Diphenylamin (3.1.1.10) in Eisessig (3.1.1.11) wurden mit 1,5 ml Schwefelsäure (3.1.1.20.) versetzt.

Diphenylamin-Acetaldehyd-Reagens (n. BURTON (22))

Unmittelbar vor der Analyse wurden 50,0 ml von Diphenylamin-Reagens mit 0,25 ml Acetaldehyd vermischt.

Kaliumacetat (3.1.1.12.) : 10%ig in Aethanol

TCE (3.1.1.23.) : 6%ige und 10%ige in dest. Wasser

3.3.3. Ausführung

0,5 ml jeder Probe wurden mit 1,0 ml 6%iger kalter TCE versetzt und 15 min in die Tiefkühltruhe verbracht. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit einem Glasstab in 4 ml 6%iger TCE resuspendiert. Nach Wiederholung dieses Analysenschrittes wurde das Sediment in 4 ml Kaliumacetat-aethanol gewaschen. Anschließend wurde das Sediment 15 min bei 90°C mit 4 ml 10%iger TCE hydrolysiert. Nach 30 min Kühlung (-15°C) wurden die Proben erneut 15 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Jeweils 1 ml der Überstände wurden der DISCHE-Reaktion (modifiziert nach BURTON) (22) unterworfen und in 1 cm Glasküvetten bei 600 und 650nm photometriert.

DISCHE-Reaktion modifiziert nach BURTON :

1 ml des klaren Überstandes wurde mit 2,0 ml Diphenylamin-Acetaldehyd-Reagens (DPA) versetzt, danach 16-20 Stunden im Dunklen bei Zimmertemperatur aufbewahrt und anschließend wie oben beschrieben photometriert.

("100 Punkt-Gemisch" = 1,0 ml 10%ige TCE + 2,0 ml DPA-Acetaldehyd-Reagens. Letzteres wurde gleichzeitig mit den DNA-haltigen Proben angesetzt.)

3.3.4. Berechnung der DNA - Konzentration

Zur Berechnung der jeweiligen DNA-Konzentration diene ein DNA-Vergleichshydrolysat (20 µg DNA/1,0 ml Vorlage). Seine Extinktionsdifferenz (555-585 nm, 1,0 cm - Küvette) betrug durchschnittlich ($n=15$) $0,038 \pm 0,018 / 1,0 \mu\text{g DNA-P} / 1,0 \text{ ml Vorlage}$.

3.4. Metachromasie von Toluidinblau an DNA (192)

3.4.1. Prinzip

Das Absorptionsmaximum wäßriger TB-Lösungen liegt im sichtbaren Spektralbereich bei 635-640 nm. In Gegenwart von Nucleinsäuren erfolgt negative Metachromasie. Die dabei auftretenden neuen Farbqualitäten haben ihr Absorptionsmaximum bei 585 und 555-560 nm. Art und Umfang dieser Metachromasie werden durch das Reaktionsmilieu, das Farbstoff/Polyanionen-Verhältnis sowie von Molekülgröße und Nativität beeinflusst (192), wobei sich die in wäßrigen Proteinlösungen gelösten hochmolekularen DNA-Präparate gegenüber RNA-Präparaten und gegenüber DNA-Proben ohne Proteinzusätze wie solche höherer Nativität verhalten. Entsprechendes Farbstoff/Nucleinsäure-Verhältnis vorausgesetzt, vermindern denaturierende Einflüsse die unter Bedingungen der Metachromasie bei 555-560 gemessene Extinktion, während sich die bei 585 nm

zu erfassende Absorption proportional dazu erhöht.
Denaturierende Einflüsse auf die DNA lassen sich somit
durch Messung der Extinktionsdifferenz (555-585 nm)
unspezifisch, aber verhältnismäßig empfindlich erfassen(192).

3.4.2. Lösungen

DNA-Lösungen geeigneter Konzentration*

Albuminlösung : 20 mg%ig in dest. Wasser

Toluidinblau (TB) : 1,67 mg%ig in dest. Wasser

3.4.3. Ausführung

Nach ihrer Isolierung werden geeignete DNA-Mengen*
in der o.a. wäßrigen Albuminlösung gelöst. 0,5 ml
dieser Lösung werden mit 3,0 ml einer wäßrigen 1,67 mg%igen
TB-Lösung versetzt. Nach kräftigem Schütteln wird die
Extinktion der Proben in 1,0 cm - Glasküvetten mit dem
Spektralphotometer PMQ II der Fa. C. Zeiss, Stuttgart-
Oberkochen, bei 555 und 585 nm gegen dest. Wasser im
"100-Punkt" gemessen.

*) Da die jeweils aus Leber bzw. Milz und Thymus der Maus
isolierten DNA-Mengen zu Analysenbeginn noch nicht bestimmt
waren, wurde das Reaktionsoptimum durch Messung einer
geeigneten Verdünnungsreihe (1:1.5; 1:2.0; 1:2.5; 1:3.0;
1:3.5; 1:4.0; 1:4.5; 1:5.0; 1:6.0) eingestellt.

3.5. Chromatographische Untersuchungen

3.5.1. Prinzip

"Chromatographie ist ein Verfahren zur Trennung eines Stoffgemisches in seine Komponenten nach dem Prinzip des Wettrennens der Molekeln über eine Hindernisstrecke. Am schnellsten ans Ziel kommen diejenigen Molekeln, die mit den Hindernissen am besten fertig werden, die anderen folgen in der Reihenfolge, wie sie die Hindernisse am besten nehmen können." (Zit. nach 150)

Die Testsubstanz (mobile Phase) wird an den "Hindernissen" (stationäre Phase) vorbeigespült. Bei der Ionenaustauschchromatographie werden dabei Substanzen verwendet, die ein großes Kation und zahlreiche Anionen oder umgekehrt abdissoziieren können (Ionenaustauscher). Sie bilden die stationäre Phase. Passiert die Testsubstanz, die ein Elektrolytgemisch ist, die stationäre Phase, findet ein Ionenaustausch statt. Die Durchlaufgeschwindigkeit der Testsubstanz hängt von der Art des Ionenaustauschers und dem Dissoziationsgrad der Testsubstanz ab, wobei dieser auch vom pH des Fließmittels beeinflusst wird (102).

Die Durchführung der Chromatographie der Nucleinsäuren erfolgte in Anlehnung an die Methode von PORTOCALLA, POPA und SAMUEL (146). Die Nucleinsäuren werden dabei an eine DEAE-(Ionenaustauscher)-Cellulose-Säule adsorbiert und mit einem NaCl-Gradienten eluiert. Der Nucleinsäuregehalt der Eluate wurde spektrophotometrisch ermittelt (56,72).

3.5.2. Lösungen

DNA - Lösungen : 0,3-0,4 mg/1,0 ml Aq. dest.

NaCl-Lösungen : 0,15-, 0,3-, 0,45-, 0,60-, 0,75-, 0,90-, 1,05-, 1,20-, 1,35-, und 1,50-Molar.

3.5.3. Ausführung

Ein zylindrisches, oben offenes Glasrohr von 2 cm Durchmesser mit Glasfritte und Auslauf wurde mit $5,0 \pm 0,1$ g DEAE-Cellulose unter mäßigem Druck trocken gefüllt. Um Aufwirbeln der Cellulose bei Zugabe von Lösungen zu verhindern, wurde die Säule oben mit einem Wattebausch abgedeckt. Das so vorbereitete Rohr wurde luftdicht auf einem 50 ml Erlenmeyer-Kolben aufgesetzt, in dem über die Verbindung mit einer Wasserstrahlpumpe ein Vakuum hergestellt werden konnte. Anschließend wurde die Säule mit 40 ml dest. Wasser gewaschen, mit 10 ml der zu untersuchenden DNA-Lösung beschickt und mit dem NaCl Gradienten eluiert. Die einzelnen Fraktionen umfaßten 9-10 ml. Der Gehalt an Nucleinsäuren und Nucleinsäurenbestandteilen wurde spektrophotometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt.

3.6. Viskosimetrische Untersuchungen

Viskosimetrische Untersuchungen haben besondere Bedeutung erlangt, weil durch sie schnell und bequem Aussagen über Form und Größe von Makromolekülen gemacht werden können. Am besten werden die Messungen an sehr verdünnten Lösungen durchgeführt, weil hydrodynamische Wechselwirkungen und zwischenmolekulare Kräfte, die zwischen den Makromolekülen herrschen, weitgehend ausgeschaltet werden. Es bleiben nur noch Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen und Lösungsmittelmolekülen.

Die Viskosität einer Lösung wird von der Störung bestimmt, die ein gelöstes Teilchen in der laminaren Strömung des Lösungsmittels verursacht. Ausdruck dafür ist die "relative Viskosität" η_r , die sich aus dem Quotienten aus Viskosität η der Lösung und Viskosität η_0 des reinen Lösungsmittels ergibt: $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}$

3.6.1. Ausführung

Die Untersuchungen wurden mit einem Viskosimeter nach OSTWALD durchgeführt. Dieses besteht aus einer U-Röhre, in deren einen Schenkel eine Kapillare eingeschmolzen ist. Eine bestimmte Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit (in den vorliegenden Versuchen : 26 ml) wird durch das weite Rohr des Viskosimeters in die Vorratskugel einpipettiert und durch die Kapillare in die Meßkugel hochgedrückt. Das Flüssigkeitsvolumen in der Meßkugel wird durch zwei Markierungen begrenzt. Durch die eigene Schwere strömt die Meßflüssigkeit durch die Kapillare. Die Durchlaufzeit wird mit einer Stoppuhr gemessen. Die Messung wird mit der gleichen Flüssigkeit wiederholt, bis innerhalb der Meßgenauigkeit reproduzierbare Werte erhalten werden.

Bei dem verwendeten Viskosimeter wurde für Aq. dest. eine mittlere Durchlaufzeit von $137,1 \pm 14,4$ sec ermittelt. Die relative Viskosität wurde prozentual auf die jeweilige Aq. dest. - Tageskontrolle bezogen. (DNA-Konz: s. 3.5.2.)

3.7. Denaturierung von DNA

3.7.1. Denaturierung von DNA durch Hitze (52, 59, 121)

3.7.1.1. Prinzip

Wird DNA in wässriger Lösung über einen Temperaturbereich von etwa 70°C hinaus erhitzt, ändert sich ihre Sekundärstruktur: Durch Spaltung von Wasserstoffbrücken erfolgt Dissoziation oder Teildissoziation der DNA-Helix in Einzelstränge. Gleichzeitig ist ein Verlust an biologischer Aktivität zu beobachten. Wird hitzedenaturierte DNA langsam abgekühlt, kann die DNA teilweise renaturiert und reaktiviert werden; rasches Abkühlen verhindert diesen Vorgang.

Eine wesentliche Rolle spielt dabei die DNA-Konzentration;

sehr niedrige Konzentrationen (10 μ /ml und weniger) verringern die Möglichkeit der unspezifischen Aggregation mehrerer Moleküle (121).

Veränderungen der DNA in ihrer Sekundärstruktur gehen mit Zunahme der optischen Dichte bei 260 nm einher.

Im Zusammenhang mit der Metachromasie von Toluidinblau an DNA vergrößert sich die Extinktionsdifferenz 555-585nm(192).

3.7.1.2. Ausführung

DNA Proben wurden in wässriger 20 mg%iger Albuminlösung in einem Wasserbad auf 90°C erhitzt und anschließend rasch in Eiswasser abgekühlt. 0,5 ml der DNA-Lösung wurden mit 3,0 ml einer 1,67 mg%igen TB-Lösung versetzt und nach kräftigem Schütteln in 1,0 cm Glasküvetten bei 555 585 nm photometriert.

3.8. Fehlerberechnung und Signifikanzanalyse

Die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert einer Versuchsreihe wurde nach folgender Formel berechnet :

$$s_x = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Erläuterung der Indices :

s_x = Standardabweichung

x_1 = Einzelwert einer Stichprobe

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der Stichproben

n = Anzahl der Stichproben einer Versuchsreihe

Die Signifikanzanalyse erfolgte nach dem "t-Test" (26).

4. ER G E B N I S S E

Anmerkung:

Die Ergebnisse sind in 31 Tabellen 12 Diagrammen zusammengefaßt.

Der 1. Abschnitt des Ergebnisteils (pp.41 bis pp.53) enthält eine nochmalige graphische Darstellung (Abb. 6) der Metachromasie von TB-Lösungen in Gegenwart von DNA sowie einige Beispiele für das Verhalten der gewählten Farbreaktion nach Vorlage denaturierter DNA-Präparate (Hitze: Abb.7, 8, 9; ionisierende Strahlen: Abb. 10 und Tab. a sowie DNase I: Abb. 11). Bereits in diese Untersuchungen sind Proben aus Milz, Thymus oder Leber der Maus isolierter DNA- Präparate (Abb. 8, 9, 11) einbezogen. Diese Proben stammen sowohl von Kontrollmäusen als auch von Tieren nach Ganzkörperperbestrahlung oder i.v. Injektion von TEM.

Eigenschaften von i n v i t r o röntgenbestrahlten DNA - Standardproben wurden mithilfe ihres chromatographischen Verhaltens an DEAE-Cellulose-Säulen (Abb. 13) sowie viskosimetrisch (Abb. 12) untersucht.

Im 2. Abschnitt des Ergebnisteils sind in vivo - Untersuchungen zusammengefaßt (Tabb. 1-31, Abb. 14-17). Aus den Tabellen 1 mit 31 ergeben sich die jeweiligen Versuchsparmeter und Meßbezüge einschließlich ihrer statistischen Bearbeitung. Anhand einiger Beispiele wurde das metachromatische Verhalten von DNA-Proben aus Leber (Tabb. 1-9, 12) sowie Milz und Thymus (Tabb. 17, 21-26, 28, 30) von Mäusen nach GKB sowie Gabe von TEM oder Actinomycin D (jeweils in vergleichsweise hoher Dosierung) untersucht, wobei Frühveränderungen besonders berücksichtigt wurden. Dem Methodenvergleich dienten säulenchromatographische und viskosimetrische Analysen (Abb. 13-17, Tab. 31).

4.1. In vitro-Versuche

4.1.1. Metachromasie von TB an DNA

Im sichtbaren Spektralbereich zeigte wäBrig gelöstes (16,7 µg/ml) TB ein Absorptionsmaximum bei 635-640 nm (Abb. 6). Zusatz von hochmolekularer Thymus-DNA (EGA-Präparat) führte zu negativer Metachromasie: Unter gleichzeitigem Extinktionsabfall traten neue Farbqualitäten auf. Letztere entsprachen einem TB/DNA-Konzentrationsverhältnis von 0,10 bzw. 0,21 und hatten ihre Absorptionsmaxima bei 585 bzw. 555-560 nm. Im jeweiligen Absorptionsmaximum verhielten sich die Maximaextinktionen bei 560, 585 bzw. 640 nm wie 1,0:0,97:1,45 (Abb. 6).

4.1.2. Metachromasie von TB an denaturierter DNA

4.1.2.1. Denaturierung der DNA durch Hitze

(s. dazu die Abb. 7-9)

Wie in Abb. 7 veranschaulicht, vergrößert sich die unter den Bedingungen der Metachromasie mit Absorptionsmaximum bei 555 nm gemessene Extinktionsdifferenz (Ext.Diff. 555-585), sobald TB mit hitzedenaturierter DNA reagiert. Die Zunahme der Ext.Diff. erfolgt proportional zum Schädigungsgrad (Dauer der Hitzeeinwirkung) und ist maximal sobald DNA 40-60 sec auf 90°C erhitzt wird. Bereits eine auf die Dauer von 5 sec bemessene Hitzeeinwirkung vergrößert die Ext.Diff. mit 26% des Maximal-effektes.

Analog verhalten sich die metachromotropen Eigenschaften von DNA-Präparaten nach ihrer Isolierung aus der Leberzellkernfraktion von normalen und hochdosiert mit TEM behandelten Mäusen, gefolgt von Hitzedenaturierung (Abb. 8). Während die beiden DNA-Präparationen untereinander weder qualitative noch quantitative Unterschiede erkennen lassen, läuft der Denaturierungsvorgang selbst offenbar um ein Mehrfaches langsamer ab als am EGA-Vergleichspräparat (Abb. 7). Letzterem näher kam das metachromotrope Verhalten von DNA nach ihrer Isolierung aus Leberhomogenat (Abb. 9).

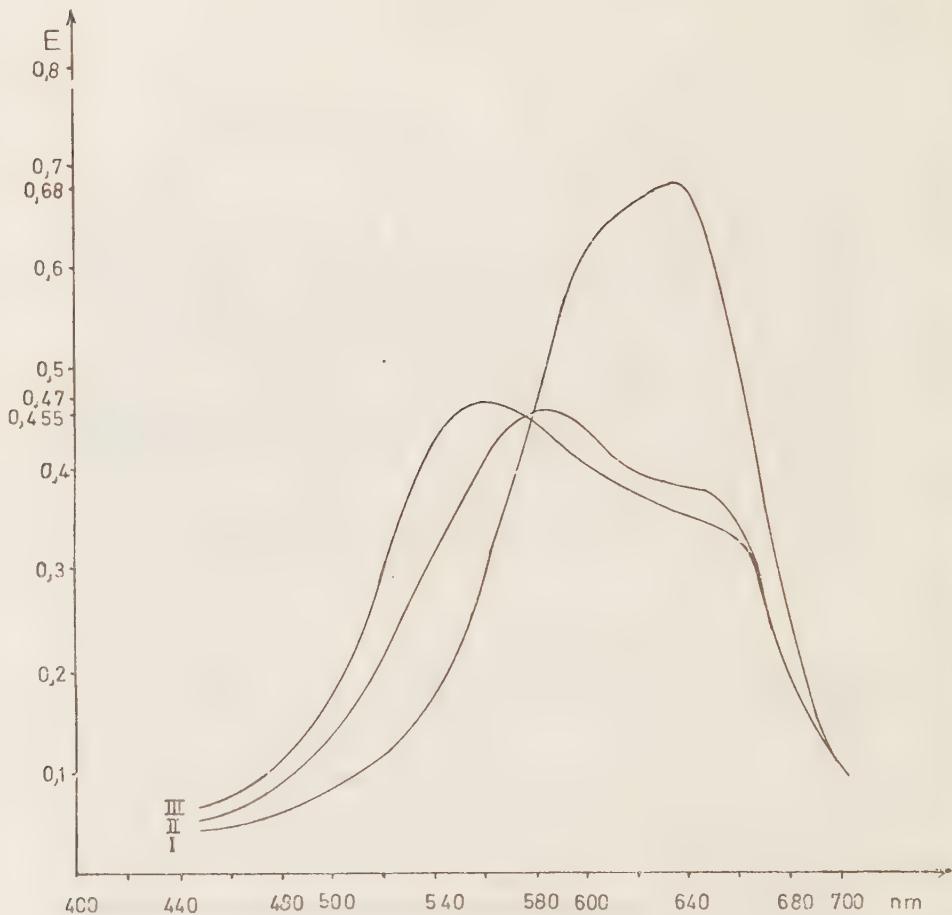


Abb. 6 : Metachromasie von wässrigen TB-Lösungen in Gegenwart hochmolekularer DNA

Abszisse : Wellenlänge in nm

Ordinate : Extinktionseinheiten

Kennzeichnung der Diagramme : Alle Lösungen enthielten 16,7 µg TB/ml

I - TB ohne DNA-Zusatz

II - TB plus 160 µg DNA/ml

III - TB plus 80 µg DNA/ml

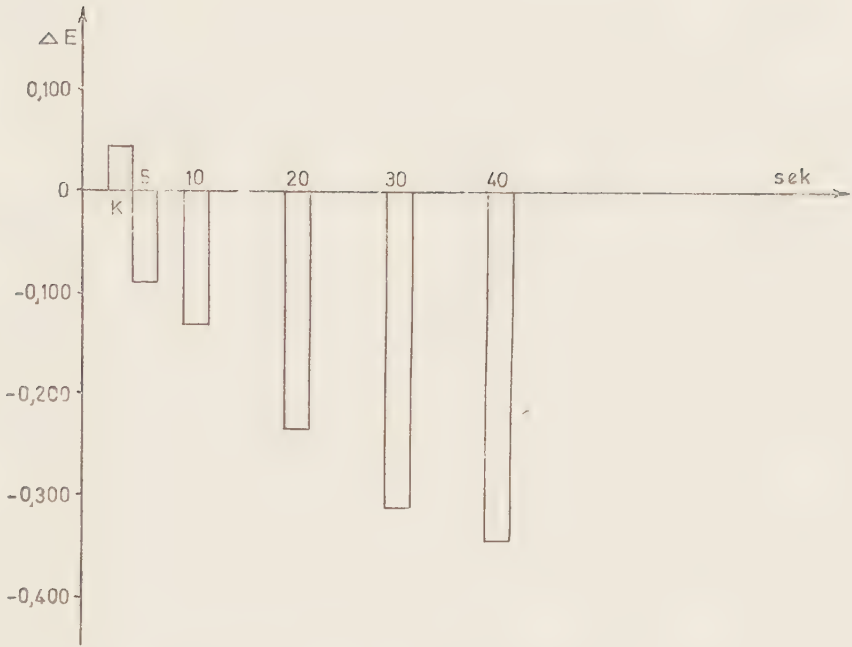


Abb. 7 : Metachromasie von TB an Standard - DNA
nach Hitzedenaturierung

Abszisse : Dauer der Erhitzung (90°C) in Sekunden

Ordinate : Ext.Diff. (555-585 nm)

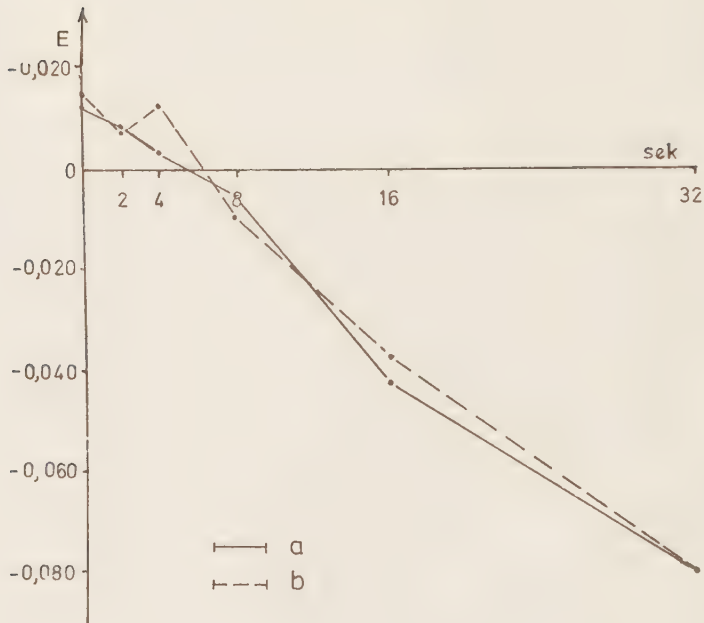


Abb. 8 : Metachromasie von TB an DNA nach Isolierung aus Mäuseleber

Abszisse : Dauer der Erhitzung (90°C) in Sekunden

Ordinate : Ext.Diff. (555-585 nm)

Kennzeichnung der Diagramme : a) DNA nach Isolierung aus der Leber von Kontrolltieren, b) DNA nach Isolierung aus der Leber von Mäusen 4 Std nach i.v. Injektion von 40mg TEM/kg K.-Gew.

Gruppendurchschnitt von jeweils 4 Tieren

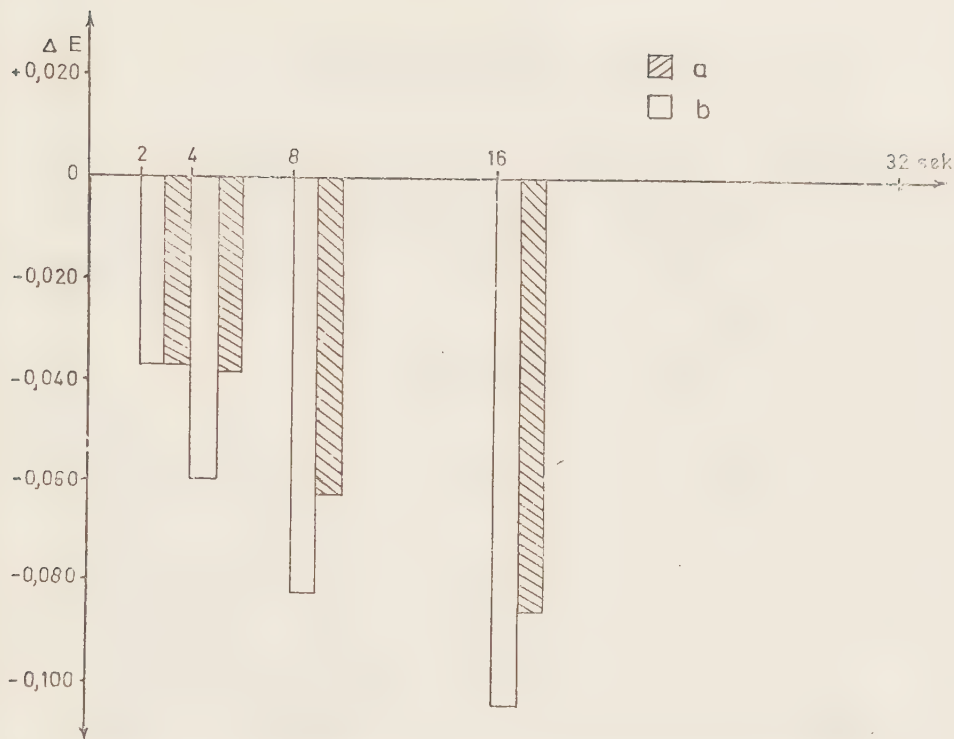


Abb. 9 : Metachromasie von TB an DNA nach Isolierung aus Mäuseleber

Abszisse : Dauer der Erhitzung (90°C) in Sekunden

Ordinate : Ext.Diff. (555-585 nm)

Kennzeichnung der Diagramme : a) DNA nach Isolierung aus der Leber von Kontrolltieren, b) DNA nach Isolierung aus der Leber von Mäusen 4 Std nach GKB mit 6000 R

4.1.2.2. Denaturierung durch Röntgenstrahlen

Werden DNA-Proben in wäßriger Albuminlösung gelöst und anschließend röntgenbestrahlt, so vermindern sich ihre bei 555nm gemessenen metachromotropen Eigenschaften gegenüber TB gleichfalls dosisproportional (Abb. 10, Tab. a). Unter den gewählten Versuchsbedingungen war die Strahlenwirkung nach Dosen von 120-180 Rad deutlich nachweisbar und nach solchen von ca. 2600 Rad halbmaximal.

4.1.2.3. Denaturierung durch DNase I

Auch DNase I-Zusätze veränderten die metachromotropen Eigenschaften von hochmolekularer DNA (Abb. 11). Die Zunahme der Ext.Diff. 555-585 nm verhielt sich (logarithmisch) proportional zur Enzymkonzentration, wobei zwischen der Vergleichs-DNA und DNA-Präparaten aus Mäuseleber kein prinzipieller Unterschied bestand. Berücksichtigt man zudem die Ausgangsextinktionsdifferenzen von 0,037 (Kontrollen) bzw. 0,048 (DNA nach ihrer Isolierung aus Lebern von Mäusen 8 Std nach GKB mit 3000 R), so zeigen auch die Konzentrations-Wirkungskurven nahezu identischen Verlauf.

4.1.2.4. Denaturierung von DNA durch Röntgenstrahlen: Viskosimetrischer Nachweis der Veränderungen

Zu den wesentlichsten Veränderungen innerhalb des DNA-Moleküls nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche (33). Dementsprechend vermindern sich Molekulargewicht und Viskosität. Als Beleg sind die in Abb. 12 veranschaulichten Versuche beigegeben: Sie lassen erkennen, daß die relative Viskosität eines DNA-Präparates (EGA-DNA) in Abhängigkeit von der Strahlendosis exponentiell abnimmt. Bereits Strahlendosen von 650 Rad führten zu einem ca. 40%-igen Viskositätsabfall. Man wird sich erinnern, daß sich die Extinktionsdifferenz (Ext.Diff. 555-585) als Ausdruck der

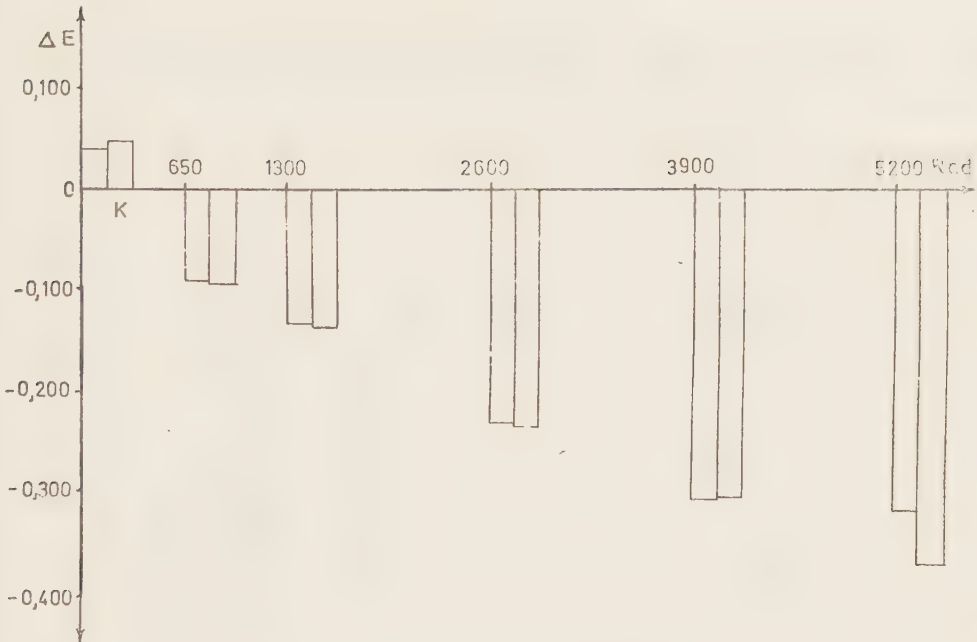


Abb. 10 : Metachromasie von TB an DNA nach Röntgenbestrahlung
in vitro *

Abszisse : Absorbierter Anteil in Rad

Ordinate : Ext.Diff. (555-585 nm)

n = 2 Bestimmungen je Diagramm

*) Versuchsanordnung siehe S.48

Tab. a : Metachromasie von Toluidinblau an DNA nach
Röntgenbestrahlung in vitro *

Bestr.Dauer	Rad	Ext.Diff. (555-585 nm)
0 min	0	+ 0,025
10 min	30	+ 0,025
20 min	60	+ 0,025
30 min	90	+ 0,025
40 min	120	+ 0,023
60 min	180	+ 0,018
80 min	240	+ 0,010

-
- *) Versuchsanordnung: Je 3,0 ml einer DNA-Albumin-Lösung (1,0 mg DNA/ 17,0 ml Albumin-Lösung) werden in kleinen Wägegläschen bei 55 kV, 30 mA ohne Filter und unter Eiswasserkühlung bestrahlt.

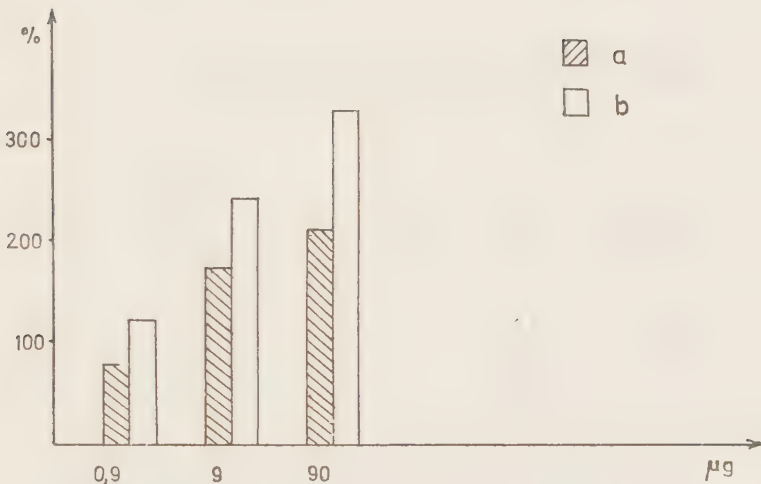


Abb. 11 : Metachromasie von TB an DNA aus Leber von bestrahlten und unbestrahlten Mäusen nach Denaturierung durch DNase I

Abszisse : DNase I-Konzentration in $\mu\text{g}/1,0 \text{ ml}$ Ansatz

Ordinate : Zunahme der Ext.Diff. (555-585 nm) in Prozent

Kennzeichnung der Diagramme : a) DNA nach ihrer Isolierung aus der Leber von Mäusen 8 Std nach GKB mit 3000 R, b) DNA nach ihrer Isolierung aus der Leber von Kontrollmäusen

Anmerkung: Ext.Diff. (555-585 nm) der Kontroll-DNA: -0,037
Ext.Diff. (555-585 nm) der DNA von Mäusen nach GKB: -0,048

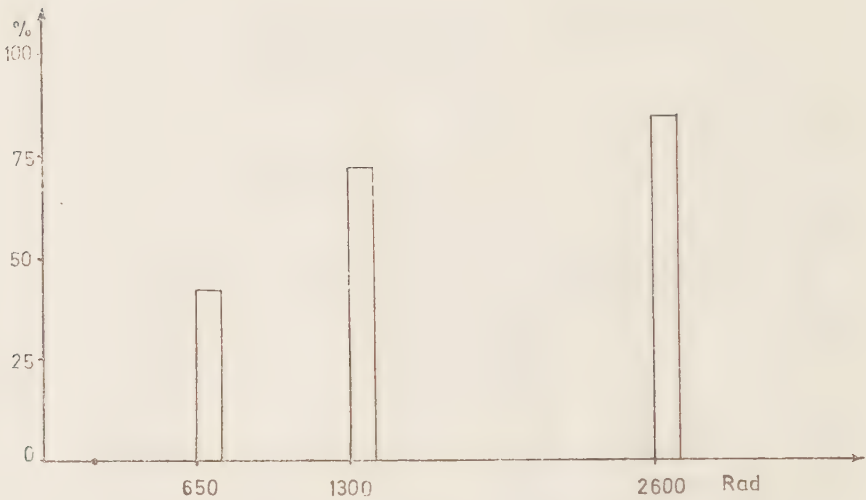


Abb. 12 : Relative Viskosität einer wässrigen Lösung von Standard-DNA unter dem Einfluß von Röntgenbestrahlung (DNA - Konzentration: 0,42 mg/1,0 ml)

Abszisse : Strahlendosis in Rad

Ordinate : Viskositätsabfall in Prozent der unbehandelten DNA

metachromotropen Eigenschaften von DNA gegenüber TB unter identischen Versuchsbedingungen um ca. 35% vergrößerte (Abb. 10) Beide Effekte sind somit auch quantitativ vergleichbar.

4.1.2.5. Denaturierung von DNA durch Röntgenstrahlen: Chromatographischer Nachweis der Veränderungen

Strahlenwirkungen an der DNA lassen sich auch säulenchromatographisch erfassen (Abb. 13, 14, 16, 17): Wird normale Thymus-DNA an DEAE-Cellulose-Säulen adsorbiert und anschließend mit einem NaCl-Gradienten eluiert, ergibt sich das in Abb. 13 wiedergegebene Fraktionierungsmuster mit Maximalausbeute im Bereich von "Fraktion 6", entsprechend einer NaCl-Molarität von 0,90. Je nach absorbiertem Strahlendosis ändert sich dieses Fraktionsmuster qualitativ und/oder quantitativ: Kleine Strahlendosen (hier 650-1300 Rad) vergrößern in praktisch allen Fraktionen den spezifisch bei 260 nm absorbierenden Anteil der Eluate. Wird die Strahlendosis weiter erhöht, vergrößert sich darüber hinaus die mit NaCl-Lösungen kleinerer Molarität eluierbaren DNA-Fraktion. Diese Feststellungen werden vorliegend besonders deutlich am Verhalten des mit 0,6 M NaCl eluierten DNA-Anteils hochdosierte (2600 Rad) bestrahlter DNA-Lösungen sowie (deutlich dosisabhängig) am Beispiel der innerhalb von Fraktion 5 aufgetretenen DNA-Anteile.

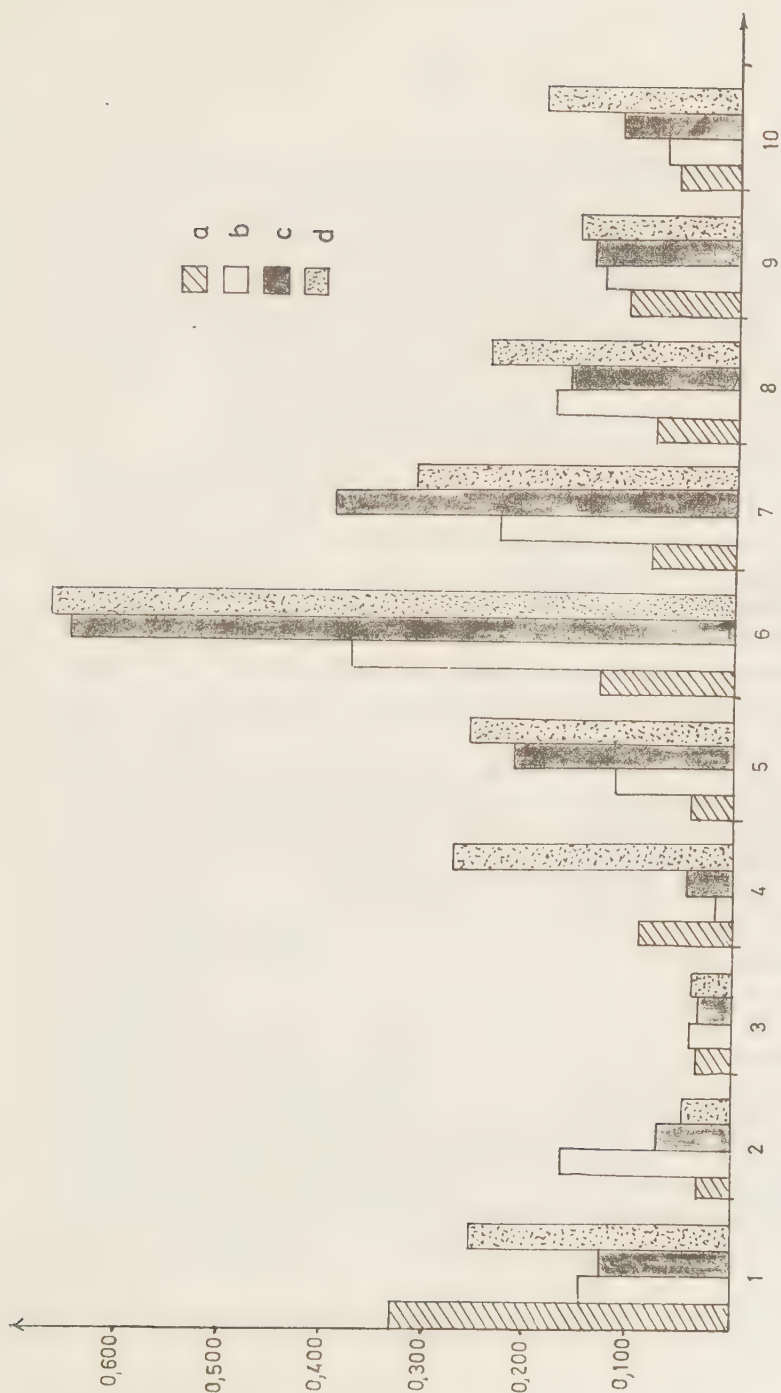
Werden die mit allen Fraktionen eluierten spezifischen Extinktionsdifferenzen (Ext.Diff. 260-280) addiert, verhalten sich die Ergebnisse bei Kontroll-DNA sowie DNA-Lösungen nach Bestrahlung mit 650, 1300 bzw. 2600 Rad wie 1:1,5:2,0:2,5.

Abb. 13 : Chromatographie von Standard-DNA an DEAE-
Cellulose-Säulen

Abszisse : Nr. der Fraktion

Ordinate : Volumen des Eluates x Ext.Diff. 260-280 nm
nach Abzug des Celluloseleerwertes

Kennzeichnung der Diagramme : a) Kontroll-DNA (3,2 mg/Säule)
b) DNA nach Bestrahlung mit 650 Rad, c) DNA nach
Bestrahlung mit 1300 Rad, d) DNA nach Bestrahlung
mit 2600 Rad



4.2. In vivo-Versuche

Alle im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen erhaltenen normalen Vergleichswerte sind in Tab. B (Leber) und Tab. D (Milz und Thymus) zusammengestellt. Sie lassen für die relative Ausbeute an DNA aus Leber sowie Milz und Thymus der Maus Durchschnittswerte von $34,91 \pm 18,89$ (Leber) bzw. $375,98 \pm 249,34$ (Milz und Thymus) erkennen.

4.2.1. Untersuchungen an Milz und Thymus (s.Tabb. 13-31, Übersicht Tab. E)

Der außerordentlichen Empfindlichkeit von Milz und Thymus gegenüber ionisierenden Strahlen und biologischen Alkylantien entsprechend verminderte sich das relative Organgewicht bereits wenige Stunden nach Versuchsbeginn sowie weitgehend zeit- und dosisabhängig (Tabb. 13-20, 23, 25-29).

Wurden Mäuse mit 3000-12000 R ganzkörper-röntgenbestrahlt, **v e r g r ö ß e r t e** sich die relative DNA-Ausbeute aus Milz und Thymus binnen 24 Stunden signifikant (Tabb. 16, 19, 20). Entsprechendes gilt für den 8 Std nach i.v. Injektion von 40 mg TEM/kg gemessenen Wert (Tab. 26). 4 und 24 Std nach hochdosierter Gabe von TEM sowie 4 Std nach i.v. Injektion von Actinomycin D in Dosen von 1,2 mg/kg hatte sich die relative DNA-Ausbeute vermindert (Tabb. 24, 27, 30). Hinsichtlich der DNA-Ausbeute ergaben sich im übrigen keine signifikanten Veränderungen.

4 Std nach GKB von Mäusen mit 6000 R (entsprechend 2000 Rad) hatte sich die bei 555 nm gemessene negative Metachromasie von TB an DNA-Proben aus Milz und Thymus signifikant vermindert (Tab. 17). Entsprechende Befunde zeigten sich - signifikant und weitgehend dosisproportional - auch für TEM in Dosen von 5-20 mg/kg, sobald die Tiere 6 Std nach Versuchsbeginn aufgearbeitet worden waren. 4-6 Std nach Gabe extrem hoher Dosen war dieser Effekt rückläufig (Tabb. 21-25, 28). Verstärkung der Metachromasie bei 555 nm wurde demzufolge 6 Std nach Gabe von 80 mg TEM/kg verzeichnet (Tab.28). Der nach kleineren Dosen bereits binnen 4-6h

nachgewiesene Verlust metachromotroper Eigenschaften wurde somit bei hohen TEM-Dosen erst später erreicht (Tab. 26).

Sieht man von dem Actinomycin D-Versuch (Tab.30) ab, veränderten sich die zum Nachweis der bei 555 nm gemessenen TB-Metachromasie optimalen DNA-Konzentrationen einerseits und der Umfang der entsprechenden Metachromasie andererseits zueinander korrelativ (Übersicht Tab. E).

4.2.2. Untersuchungen an der Leber

Die Untersuchungen an der Leber bieten insgesamt ein weniger einheitliches Bild (Tabb. 1-12, Übersicht Tab. C).

4 Std nach GKB von Mäusen mit 6000 R hatte sich das relative Leberfrischgewicht signifikant erhöht (Tab.6). Zu statistisch relevanten Veränderungen der relativen DNA-Ausbeute kam es nur bei Bezug auf den jeweiligen Tages-Kontroll-Durchschnitt (Tabb. 1-5, 7, 10, 12). Verminderte Ausbeute zeigte sich durchwegs bei Isolierung der DNA aus den Organhomogenaten wenige Stunden nach hochdosierter GKB (Tab.. 2-5). Unmittelbar nach Bestrahlung mit 3000 R war die DNA-Ausbeute dagegen erhöht (Tab. 1). Wurden die DNA-Proben aus der Zellkernfraktion der Leber gewonnen, vergrößerte sich die relative DNA-Ausbeute 4 Std nach GKB mit 6000 R bzw. i.v. Injektion von Actinomycin D in Dosen von 1,2 mg/kg (Tab. 7, 12). Zu gegenüber dem Kontrolldurchschnitt verminderte DNA-Ausbeute führten Zellkernfraktionen der Leber von Mäusen bei Aufarbeitung binnen 8 und 24 Std nach i.v. Injektion von 40 mg TEM/kg K.-Gew. (Tabb. 9, 10). 0 und 4 Std nach hochdosierter GKB von Mäusen war die bei 555 nm gemessene metachromotrope Aktivität von DNA-Proben nach Isolierung aus Leber-Homogenaten signifikant vermindert (Tabb. 1, 3). Verstärkte metachromatische Aktivität zeigten DNA-Proben unter den gleichen Aufarbeitungsbedingungen 2, 8 und 24 Std nach Bestrahlung (Tabb. 2,4,5). Entsprechendes gilt auch für GKB sowie für TEM und Actinomycin D bei DNA-Isolierung aus der zuvor gereinigten Zellkernfraktion (Tabb. 7, 9, 12).

4.2.3. Viskosimetrische und säulenchromatographische Untersuchungen

Soweit das Verhalten der bei 555 nm gemessenen metachromatischen Aktivität von DNA-Präparationen aus Organen der Maus 4-6 Std nach hochdosierter 3KB oder TEM-Behandlung Schlüsse auf strukturelle Eigenschaften der unter diesen Bedingungen isolierten DNA-Präparate zulässt, ist mit einem Abfall ihrer Nativität im Sinne einer Molekülverkleinerung zu rechnen.

In diesem Falle sollten sich der aus DEAE-Cellulose-Säulen eluierbare, spezifisch bei 260 nm absorbierende DNA-Anteil vergrößern und die relative Viskosität vermindern. Ersteres wird durch die Diagramme der Abb. 14-17, letzteres durch die in Tab. 31 wiedergegebenen Ergebnisse bestätigt. Verglichen mit dem Verhalten von DNA aus Milz und Thymus hochdosiert ganzkörperbestrahlter Mäuse, erbrachte die Chromatographie von Leber-DNA an DEAE-Cellulose-Säulen unter identischen Bedingungen ihrer Richtung nach gleiche, ihrer Quantität nach wesentlich schwächere Veränderungen.

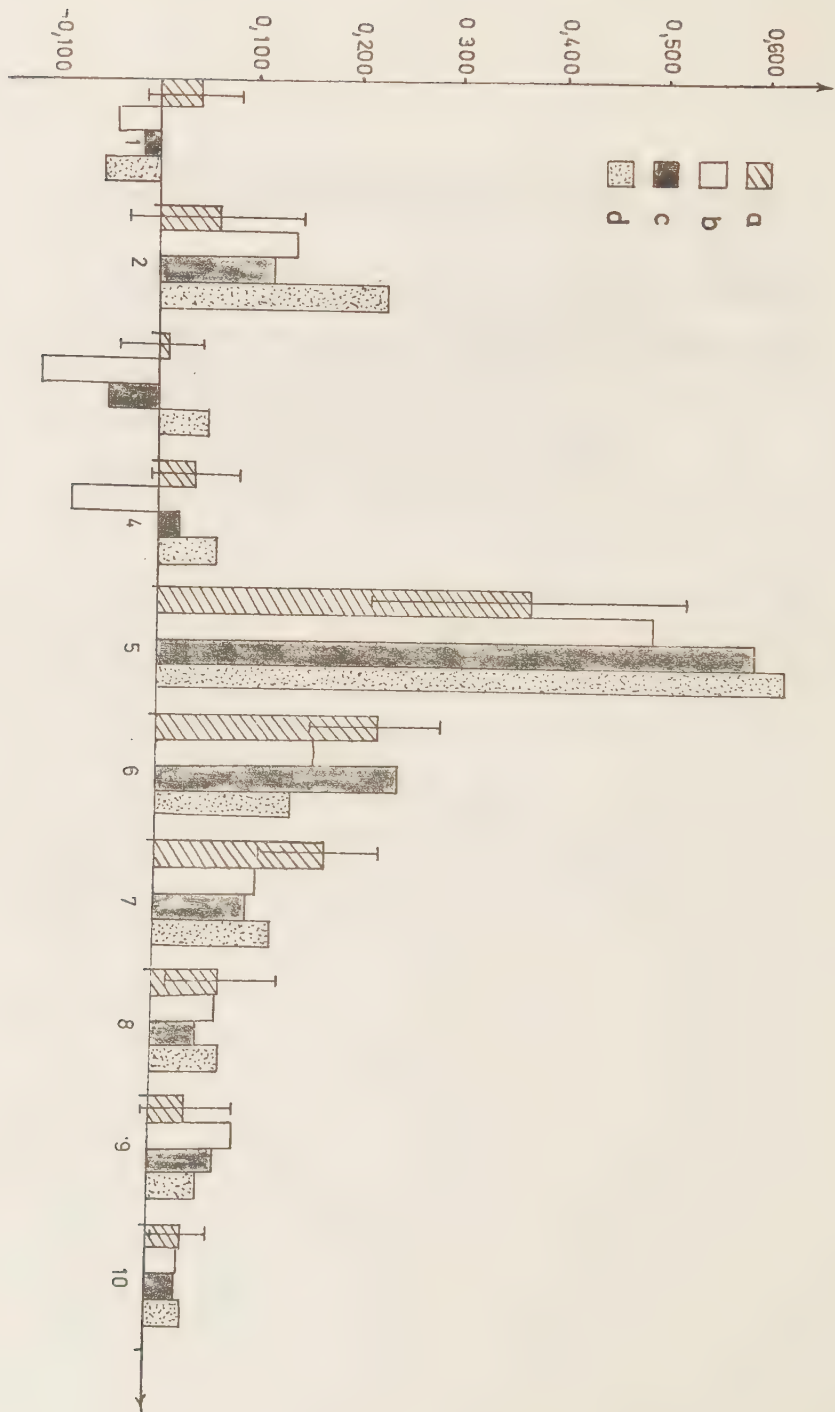
Die im Diagramm der Abbildungen schließlich dargestellten Ergebnisse belegen die Dosisabhängigkeit der Veränderungen hinsichtlich der mit 0,75 M NaCl eluierbaren DNA-Fraktion. Aus dem Säulenchromatogramm sind bereits Strahlendosen von 450 R ablesbar.

Abb. 14 : Chromatographie von DNA an DEAE-Cellulose-Säulen nach Isolierung aus Milz und Thymus der Maus

Abszisse : Nr. der Fraktion

Ordinate : Volumen des Eluates x Ext.Diff. 260-280 nm nach Abzug des Celluloseleerwertes

Kennzeichnung der Diagramme : a) DNA nach Isolierung aus Milz und Thymus von Kontrolltieren,
b) DNA nach Isolierung aus Milz und Thymus von Mäusen 6 Std nach GKB mit 450 R
c) DNA nach Isolierung aus Milz und Thymus von Mäusen 6 Std nach GKB mit 900 R,
d) DNA nach Isolierung aus Milz und Thymus von Mäusen 6 Std nach GKB mit 1800 R



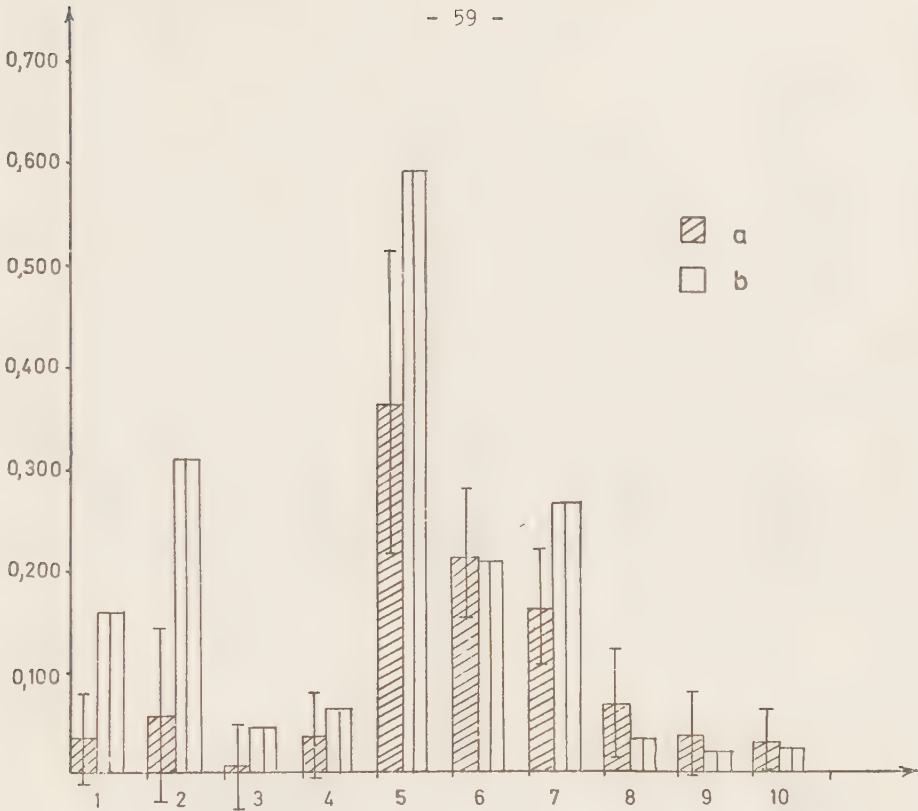


Abb. 15 : Chromatographie von DNA an DEAE-Cellulose-Säulen nach Isolierung aus Milz und Thymus der Maus

Abszisse : Nr. der Fraktion

Ordinate : Volumen des Eluates x Ext.Diff. 260-280 nm nach Abzug des Celluloseleerwertes

Kennzeichnung der Diagramme : a) DNA nach Isolierung aus Milz und Thymus von Kontrolltieren, b) DNA nach Isolierung aus Milz und Thymus von Mäusen 6 Std p. inj. von 20 mg TEM/kg K.-Gew.

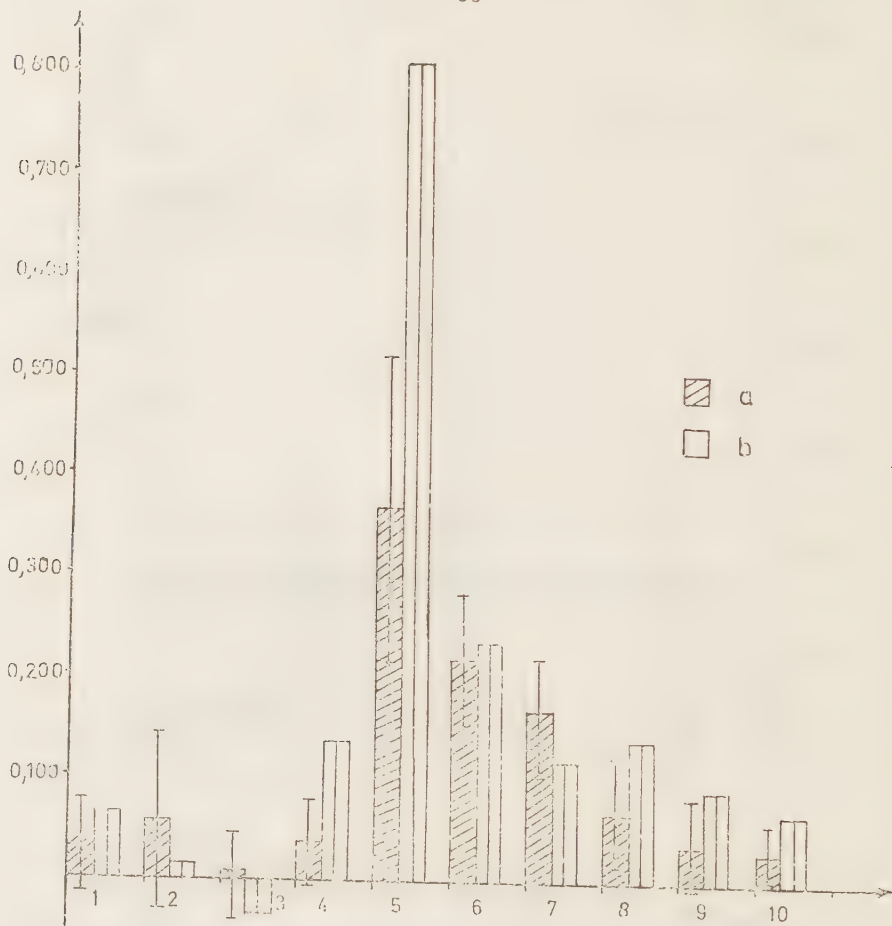


Abb. 16 : Chromatographie von DNA an DEAE-Cellulose-Säulen nach Isolierung aus Milz und Thymus der Maus

Abszisse : Nr. der Fraktion

Ordinate : Volumen des Eluates x Ext.Diff. 260-280 nm nach Abzug des Celluloseleerwertes

Kennzeichnung der Diagramme : a) DNA nach Isolierung aus Milz und Thymus von Kontrolltieren, b) DNA nach Isolierung aus Milz und Thymus von Mäusen 6 Std nach GKB mit 3600 R



Abb. 17 : Chromatographie von DNA an DEAE-Cellulose-Säulen nach Isolierung aus Mäuseleber

Abszisse : Nr. der Fraktion

Ordinate : Volumen des Eluates x Ext.Diff. 260-280 nm nach Abzug des Celluloseleerwertes

Kennzeichnung der Diagramme : a) DNA nach Isolierung aus der Leber von Kontrolltieren, b) DNA nach Isolierung aus der Leber von Mäusen 6 Std nach GKB mit 3600 R

$\frac{TB \cdot B}{K \cdot B} = B$: Normalwerte
 Abkürzungen für Tab. 1 bis 31 :

K.-Gew. : Körpergewicht in g
 O.-Gew. : Absolutes Gewicht der Leber in g
 R.-Gew. : Relatives Gewicht der Leber in g/1,0 g K.-Gew.
 DNA : DNA-Ausbeute in mg/1,0 g Organ-Relativgewicht
 DNA' : DNA-Ausbeute in mg/1,0 g Organ-Relativgewicht
 : Arithmetisches Mittel der jeweiligen Kontrollwerte
 TB : Ext.Diff. zwischen 555 und 585 nm bei optimalem
 DNA/TB-Verhältnis
 TBs : Ext.Diff. zwischen 555 und 585 nm bei optimalem
 DNA/TB-Verhältnis 24 Std nach Ansatz.
 TB-Konz. : DNA-Konzentration bei optimalem DNA/TB Verhältnis
 TB' : Ext.Diff. zwischen 555 und 585 nm bei optimalem DNA/TB-
 Verhältnis. Arithmetisches Mittel der jeweiligen Kontrollwerte

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	TB	TBs	TB-Konz.
$\bar{x}$	20,88	1,099	0,053	34,91	-0,029	0,007	0,071
s_x	1,62	0,267	0,012	18,89	0,041	0,018	0,040
n	32	32	32	15	47	47	47

Tab. 1 : Leber der Mäus unter dem Einfluss von GKB
 Dosis : 3000 R
Aufarbeitungszeitpunkt : unmittelbar nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	20,25	0,924	0,046	40,10	20,70	-0,058	-0,050	0,029
s_x	0,96	0,051	0,002	16,85	8,60	0,022	0,022	0,20
t	0,748	1,295	1,162	0,493	2,320	2,131	0,738	2,885
p	<0,25 >0,20	<0,15 >0,10	<0,15 >0,10	<0,35 >0,30	<0,05 >0,025	<0,025 >0,0125	<0,25 >0,20	<0,005 >0,0025
n	4	4	4	4	4	8	8	8

Tab. 2 : Leber der Maus unter dem Einfluß von GKB

Dosis : 3000 R

Anarbeitungszeitpunkt : 2 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz
$\bar{x}$	20,25	1,087	0,051	36,1	55,06	-0,013	-0,095	0,080
s_x	1,51	0,051	0,00	0,00 *	3,17	0,004	0,025	0,000 *
t	0,291	0,065	0,244	0,087	8,301	0,674	5,410	0,403
p	<0,40 >0,35	<0,475 >0,450	<0,45 >0,40	<0,475 >0,450	<0,025 >0,005	<0,30 >0,25	<0,0025 >0,0005	<0,25 >0,20
n	6	2	2	2	2	3	6	3

Da die DNA-Vorlage in zahlreichen Versuchen sehr gering war, wurden hier mehrere Messungen an dem gleichen Ausgangsmaterial vorgenommen. Entsprechendes gilt auch für die in den nachfolgenden Tabellen mit *) gekennzeichneten Standardabweichungen.

Tab. 3 : Leber der Mäus unter dem Einfluß von GKB
Dosis : 3000 R
Aufarbeitungszeitpunkt : 4 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	20,67	0,941	0,049	30,42	55,06	-0,115	-0,095	0,055
s_x	1,51	0,320	0,013	0,00 *	3,17	0,009	0,025	0,00 *
t	0,291	0,809	0,417	0,327	10,94	3,581	1,337	0,659
p	<0,40 >0,35	<0,25 >0,20	<0,35 >0,30	<0,40 >0,35	<0,0005 -	<0,0005 -	<0,15 >0,10	<0,30 >0,25
n	6	2	2	2	2	3	6	3

Fig. 4 : Leber der Maus unter dem Einfluß von GKB
Dosis : 3000 R

Aufarbeitungszeitpunkt : 8 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz
$\bar{x}$	20,67	1,054	0,049	38,97	55,06	-0,009	-0,095	0,095
s_x	1,51	0,344	0,014	10,08	3,17	0,003	0,025	0,00 *
t	0,291	0,231	0,416	0,293	2,153	0,827	5,671	1,041
p	<0,40 >0,35	<0,45 >0,40	<0,35 >0,30	<0,40 >0,35	<0,05 >0,025	<0,25 >0,20	<0,0005 -	<0,20 >0,15
n	6	2	2	2	2	3	6	3

Abb. 5 : Leber der Maus unter dem Einfluss von GKB
Dosis : 3000 R
Aufarbeitungszeitpunkt : 24 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-konz.
$\bar{x}$	19,75	1,133	0,057	36,58	67,24	0,0034	0,006	0,063
s_x	2,06	0,179	0,005	0,00 *	0,14	0,018	0,023	0,00 *
t	1,27	0,245	0,826	0,122	169,22	2,191	1,049	0,522
p	<0,15 >0,10	<0,45 >0,40	<0,25 >0,20	<0,475 >0,45	<0,0005 -	<0,025 >0,0125	<0,10 >0,05	<0,35 >0,30
n	4	4	4	2	2	8	15	8

Tab. 6 : Leber der Mäus unter dem Einfluß von GKB
Dosis : 6000 R

Aufarbeitungszeitpunkt : 4 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	20,33	1,415	0,069	28,1	35,04	-0,065	-0,050	0,036
s_x	0,82	0,495	0,024	14,2	22,74	0,000 *	0,000 *	0,004
t	0,851	2,293	2,81	0,798	0,536	1,222	10,206	1,196
p	<0,25 >0,20	<0,025 >0,0125	<0,005 >0,0025	<0,25 >0,20	<0,35 >0,30	<0,15 >0,10	<0,0005 -	<0,15 >0,10
n	6	6	6	6	2	2	3	2

Tab. 7 : Leber der Maus unter dem Einfluss von GKB
Dosis : 6000 R
Aufbereitungszeitpunkt : 4 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	20,00	1,176	0,059	49,52	34,68	0,020	0,007	0,098
$s_{\bar{x}}$	0,82	0,286	0,013	0,00 *	0,14	0,014	0,012	0,00 *
t	1,052	0,540	1,031	1,064	67,26	3,393	2,050	1,911
p	<0,15 >0,10	<0,30 >0,25	<0,20 >0,15	<0,20 >0,15	<0,0005 -	<0,0025 >0,0005	<0,05 >0,025	<0,05 >0,025
n	4	4	4	2	2	8	8	8

Tab. 8 : Leber der Maus unter dem Einfluß von TEM
Dosis : 40 mg/kg K.Gew.
Aufarbeitungszeitpunkt : 4 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz
$\bar{x}$	23,75	1,437	0,061	65,40	64,17	-0,004	0,005	0,114
s_x	0,50	0,167	0,006	0,00*	0,21	0,010	0,027	0,00 *
t	3,485	2,451	1,377	2,22	7,360	1,235	0,598	2,135
p	<0,0025 >0,0005	<0,010 >0,005	<0,10 >0,05	<0,025 >0,0125	<0,005 >0,0025	<0,15 >0,10	<0,30 >0,25	<0,025 >0,0125
n	4	4	4	2	2	4	4	4

Tab. 9 : Leber der Mäus unter dem Einfluß von TEM
Dosis : 40 mg/kg K.-Gew.
Aufarbeitungszeitpunkt : 8 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	23,25	1,170	0,050	33,04	64,17	0,031	0,005	0,080
s_x	2,22	0,388	0,014	0,00 *	0,21	0,002	0,027	0,00 *
t	2,661	0,477	0,358	0,136	172,10	2,913	1,979	0,466
p	<0,01 >0,005	<0,35 >0,30	<0,40 >0,35	<0,45 >0,40	<0,0005 -	<0,005 >0,0025	<0,05 >0,025	<0,35 >0,30
n	4	4	4	2	2	4	4	4

Tab.10 : Leber der Maus unter dem Einfluß von TEM

Dosis : 40 mg/kg K.-Gew.

Aufarbeitungszeitpunkt : 24 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	20,25	1,234	0,062	19,22	64,17
s_x	3,50	0,076	0,012	0,00 *	0,21
t	0,632	0,989	1,624	1,142	283,99
p	<0,30	<0,20	<0,10	<0,15	<0,0005
	>0,25	>0,15	>0,05	>0,10	-
n	4	4	4	2	2

Tab. 11 : Leber der Maus unter dem Einfluß
von Actinomycin D

Dosis : 0,6 mg/kg K.-Gew.

Aufarbeitungszeitpunkt : 4 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	19,75	0,829	0,042	29,83	20,05
s_x	0,5	0,147	0,007	4,17	6,19
t	1,364	1,973	1,794	0,523	2,523
p	<0,10	<0,05	<0,05	<0,35	<0,05
	>0,05	>0,025	>0,025	>0,30	>0,025
n	4	4	4	4	3

Tab. 12 : Leber der Maus unter dem Einfluss von Actinomycin D
Dosis : 1,2 mg/kg K.-Gew.
Aufarbeitungszeitpunkt : 4 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	20,00	0,979	0,049	39,30	34,48	0,001	-0,066	0,132
s_x	0,50	0,136	0,007	0,00 *	0,23	0,031	0,020	0,020
t	1,06	0,879	0,634	0,309	26,073	2,071	4,348	4,433
p	<0,15 >0,10	<0,20 >0,15	<0,30 >0,25	<0,40 >0,35	<0,0005 -	<0,025 >0,0125	<0,0025 >0,0005	<0,0025 >0,0005
n	4	4	4	2	2	9	5	9

Tab. C : Untersuchungen zur Wirkung von GKB, TEM
und Actinomycin D auf die Mäuseleber in
Übersicht. Bewegungen der jeweiligen
Meßparameter (+ = Zunahme; - = Abnahme)

Spalte A : Tabellen Nr.

Spalte B : Versuchstyp

Spalte C : Dosis in R bzw. mg/kg K.-Gew.

Spalte D : Aufarbeitungszeitpunkt in Std nach Abschluß
der Bestrahlung bzw. p. inj.

im übrigen s. Tabbb. 1-12

Tab. 9 :

A	B	C	D	K.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz
1	GKB	3000	0	-	-	+	+	- *	+	- **
2	GKB	3000	2	-	-	+	- *	+	+	+
3	GKB	3000	4	-	-	-	- **	- ****	- *	-
4	GKB	3000	8	-	-	+	- *	+	+	+
5	GKB	3000	24	-	+	+	- ***	+	-	-
5	GKB	6000	4	-	+	-	-	-	- ***	-
7	GKB	6000	4	-	+	+	+	+	+	+
8	TEM	40	4	+	+	+	+	+	+	+
9	TEM	40	8	+	+	-	- ***	+	+	+
10	TEM	40	24	-	+	-	- ***	+	+	+
11	Act.D.	0,6	4	-	- *	-	+	+	+	+
12	Act.D.	1,2	4	-	-	+	+	+	+	+

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

geb. D :
Normalwerte : Milz und Thymus

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	TB	TB-Konz.	TB ^a
$\bar{x}$	21,31	0,229	0,011	375,98	0,026	0,116	0,011
s_x	2,23	0,041	0,002	249,34	0,016	0,056	0,018
n	36	36	36	19	26	26	23

Tab.13 : Milz und Thymus der Maus unter dem
Einfluß von GKB

Dosis : 3000 R

Aufarbeitungszeitpunkt : 2 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	21,5	0,171	0,008	83,05	63,55
s_x	0,71	0,021	0,001	21,7	0,35
t	0,122	1,915	1,661	1,524	1,270
p	<0,475	<0,05	<0,10	<0,10	<0,15
	>0,45	>0,025	>0,05	>0,05	>0,10
n	2	2	2	2	2

Tab.14 : Milz und Thymus der Maus unter dem
Einfluß von GKB

Dosis : 3000 R

Aufarbeitungszeitpunkt : 4 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	19,0	0,143	0,0075	93,0	63,55
s_x	1,41	0,007	0,000	29,56	0,35
t	1,436	2,892	1,959	1,468	1,409
p	<0,05	<0,005	<0,05	<0,10	<0,15
	>0,10	>0,0025	>0,025	>0,05	>0,10
n	2	2	2	2	2

Tab. 15 : Milz und Thymus der Maus unter dem
Einfluß von GKB

Dosis : 3000 R

Aufarbeitungszeitpunkt : 8 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	21,5	0,160	0,0075	80,4	63,55
s_x	0,71	0,047	0,0024	62,26	0,35
t	0,121	2,278	1,988	1,536	0,382
p	<0,475	<0,025	<0,05	<0,10	<0,40
	>0,45	>0,0125	>0,025	>0,05	>0,35
n	2	2	2	2	2

Tab. 16 : Milz und Thymus der Maus unter dem
Einfluß von GKB

Dosis : 3000 R

Aufarbeitungszeitpunkt : 24 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	20,75	0,088	0,0042	405,0	78,65
s_x	2,12	0,000	0,000	0,000*	0,07
t	0,643	9,535	7,822	0,261	1280,8
p	<0,30	<0,0005	<0,0005	<0,40	<0,0005
	>0,25	-	-	>0,35	-
n	8	8	8	2	2

Tab. 17 : Milz und Thymus der Mäus unter dem Einfluß von GKB
 Dosis : 6000 R
Aufarbeitungszeitpunkt : 4 Std. nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	20,0	0,161	0,008	254,5	444,98	0,010	0,0176	0,089
$s_{\bar{x}}$	0,82	0,015	0,000	57,22	323,08	0,006	0,007	0,000 *
t	1,152	3,273	2,514	0,811	1,161	2,706	2,299	1,334
p	<0,15 >0,10	<0,0025 >0,0005	<0,01 >0,005	<0,25 >0,20	<0,15 >0,10	<0,01 >0,005	<0,025 >0,0125	<0,10 >0,05
n	4	4	4	4	8	8	8	8

Tab. 18 : Milz und Thymus der Maus unter dem
Einfluß von GKB

Dosis : 6000 R

Aufarbeitungszeitpunkt : 4 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	20,33	0,140	0,007	192,70	186,30
s_x	0,82	0,014	0,00	83,70	11,88
t	1,048	5,190	4,228	1,440	0,101
p	<0,20	<0,0005	<0,0005	<0,10	<0,475
	>0,15	-	-	>0,05	>0,450
n	6	6	6	5	2

Tab. 19 : Milz und Thymus der Maus unter dem
Einfluß von GKB

Dosis : 6000 R

Aufarbeitungszeitpunkt : 24 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	17,50	0,063	0,0036	437,5	78,65
s_x	1,93	0,00	0,00	0,00*	0,07
t	4,466	11,218	8,510	0,441	1741,3
p	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,25	<0,0005
	-	-	-	>0,30	-
n	8	8	8	2	2

Tab. 20 : Milz und Thymus der Maus unter dem
Einfluß von GKB

Dosis : 12000 R

Aufarbeitungszeitpunkt : 24 Std nach GKB

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	19,13	0,064	0,003	397,4	78,15
$s_{\bar{x}}$	0,99	0,00	0,00	0,00 *	0,07
t	2,691	11,017	8,851	0,219	2852,0
p	<0,01	<0,0005	<0,0005	<0,45	<0,0005
	>0,005	-	-	>0,40	-
n	8	8	8	2	2

Tab. 21 : Milz und Thymus der Mause unter dem Einfluss von TEM
Dosis : 5 mg/kg K.-Gew.
Aufarbeitungszeitpunkt : 6 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	22,75	0,208	0,009	470,9	455,10	0,029	0,036	0,080
s_x	2,63	0,011	0,000	145,2	106,21	0,005	0,002	0,000 *
t	1,212	0,986	1,559	0,620	0,124	0,306	2,745	1,256
p	<0,15 >0,10	<0,20 >0,15	<0,10 >0,05	<0,30 >0,25	<0,475 >0,450	<0,40 >0,35	<0,025 >0,0125	<0,15 >0,10
n	4	4	4	2	2	4	4	4

Tab. 22 : Milz und Thymus der Maus unter dem Einfluß von TEM
Dosis : 10 mg/kg K.-Gew.

Aufarbeitungszeitpunkt : 6 Std p. inf.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	20,5	0,224	0,0113	441,2	455,10	0,019	0,035	0,088
s_x	3,0	0,047	0,0028	7,64	106,21	0,003	0,002	0,00 *
t	0,665	0,200	0,1658	0,461	0,1846	0,863	9,671	0,974
p	<0,30 >0,25	<0,45 >0,40	<0,45 >0,40	<0,35 >0,30	<0,45 >0,40	<0,20 >0,15	<0,0005 >0,00025	<0,20 >0,15
n	4	4	4	2	2	4	4	4

Tab. 22 : M12 und Thymus der Maus unter dem Einfluss von TEM

Dosis : 20 mg/kg K.-Gew.

Aufarbeitungszeitpunkt : 6 Std p. inf.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-konz.
$\bar{x}$	24,0	0,202	0,008	504,7	455,10	0,016	0,036	0,078
s_x	0,82	0,024	0,001	196,7	106,21	0,003	0,002	0,00 *
t	2,378	1,283	2,238	0,800	0,314	1,252	11,547	1,248
p	<0,0125 >0,01	<0,15 >0,10	<0,025 >0,0125	<0,25 >0,20	<0,40 >0,35	<0,15 >0,10	<0,0005 >0,00025	<0,15 >0,10
n	4	4	4	2	2	4	4	4

Tab. 24 : Milz und Thymus der Maus unter dem Einfluss von TEK
Dosis : 40 mg/kg K.-Gew.
Aufarbeitungszeitpunkt : 4. Std. p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	23,75	0,264	0,011	255,9	376,85	0,022	0,026	0,075
s_x	0,50	0,035	0,001	0,00*	0,07	0,008	0,003	0,00 *
t	2,165	1,626	0,054	0,566	1343,6	0,042	0,912	1,238
p	<0,025	<0,10	<0,4875	<0,30	<0,0005	<0,4875	<0,20	<0,15
	>0,0125	>0,05	>0,475	>0,25	"	>0,475	>0,15	>0,10
n	4	4	4	2	2	3	4	3

Tab. 25 : Milz und Thymus der Maus unter dem Einfluß von TEM
 Dosis : 40 mg/kg K.-Gew.
Aufarbeitungszeitpunkt : 6 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	22,75	0,186	0,008	455,0	770,0	0,021	0,021	0,067
$s_{\bar{x}}$	2,22	0,006	0,00	36,8	224,86	0,002	0,007	0,00*
t	1,231	2,063	2,408	0,537	1,955	0,683	0,127	1,644
p	<0,10	<0,025	<0,0125	<0,30	<0,20	<0,30	<0,015	<0,10
n	>0,10	>0,0125	>0,01	>0,25	>0,15	>0,25	>0,010	>0,05
	4	4	4	2	2	4	4	4

Tab. 26 : Milz und Thymus der Maus unter dem Einfluss von TEM
Dosis : 40 mg/kg K.-Gew.
Aufarbeitungszeitpunkt : 8 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	23,25	0,161	0,007	612,9	376,85	0,015	0,026	0,071
s_x	2,22	0,016	0,001	0,00*	0,07	0,003	0,003	0,000*
t	1,656	3,204	3,426	1,413.	3339,46	1,312	4,950	1,572
p	<0,10 >0,05	<0,0025 >0,0005	<0,025 >0,0005	<0,45 >0,05	<0,0005 -	<0,15 >0,10	<0,0025 >0,0005	<0,10 >0,05
n	4	4	4	2	2	4	4	4

Tab. 27 : Milz und Thymus der Maus unter dem
Einfluß von TEM

Dosis : 40 mg/kg K.-Gew.

Aufarbeitungszeitpunkt : 24 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNase
$\bar{x}$	20,25	0,086	0,0043	305,8	376,85
s_x	3,5	0,004	0,00	0,00*	0,07
t	0,851	6,831	5,761	0,289	1004,2
F	<0,25	<0,0005	<0,0005	<0,40	<0,0005
	>0,20	-	-	>0,35	-
n	4	4	4	2	2

Tab. 28 : Milz und Thymus der Maus unter dem Einfluss von TEM
Dosis : 80 mg/kg K.-Gew.
Aufarbeitungszeitpunkt : 6 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz.
$\bar{x}$	22,75	0,172	0,008	512,8	770,0	0,026	0,021	0,070
s_x	2,22	0,010	0,00	104,3	224,86	0,004	0,007	0,00 *
t	1,231	2,716	2,960	0,854	1,468	0,007	1,255	1,570
p	<0,15 >0,10	<0,005 >0,0025	<0,005 >0,0025	<0,25 >0,20	<0,15 >0,10	<0,4975 >0,4950	<0,15 >0,10	<0,00 >0,05
n	4	4	4	2	2	4	4	4

Tab. 29 : Milz und Thymus der Maus unter dem
Einfluß von Actinomycin D

Dosis : 0,6 mg/kg K.-Gew.

Aufarbeitungszeitpunkt : 4 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA'
$\bar{x}$	19,75	0,177	0,009	380,2	338,23
s_x	0,50	0,017	0,001	31,2	106,56
t	1,378	2,454	1,728	0,175	0,756
p	<0,10	<0,01	<0,05	<0,45	<0,25
	>0,05	>0,005	>0,025	>0,40	>0,20
n	4	4	4	4	4

Tab. 20 : Milz und Thymus der Maus unter dem Einfluss von Actinomycin D
Dosis : 1,2 mg/kg K.-Gew.
Anfangszeitpunkt : 4 Std p. inj.

	K.-Gew.	O.-Gew.	R.-Gew.	DNA	DNA ¹	TB	TB ¹	TB-Konz.
$\bar{x}$	20,0	0,187	0,009	216,2	265,6	0,021	0,009	0,055
$s_{\bar{x}}$	0,82	0,024	0,001	0,00 *	0,14	0,001	0,016	0,00 *
t	1,159	1,954	1,452	0,786	334,51	0,505	1,290	1,847
p	<0,15 >0,10	<0,05 >0,025	<0,10 >0,05	<0,25 >0,20	<0,0005 -	<0,35 >0,30	<0,15 >0,10	<0,05 >0,025
n	4	4	4	2	2	3	3	3

Tab. E : Untersuchungen zur Wirkung von GKB, TEM
und Actinomycin D auf Milz und Thymus der
Maus in Übersicht. Bewegungen der jeweiligen
Meßparameter (+ = Zunahme; - = Abnahme)

Spalte A : Tabellen Nr.

Spalte B : Versuchstyp

Spalte C : Dosis in R bzw. mg/kg K.-Gew.

Spalte D : Aufarbeitungszeitpunkt in Std nach Abschluß
der Bestrahlung bzw. p. inj.

im übrigen s. Tabb. 13-30

Tab. E :

A	B	C	D	K.-Gew	R.-Gew.	DNA	DNA'	TB	TB'	TB-Konz
13	GKB	3000	2	+	-	-	+			
14	GKB	3000	4	-	- *	-	+			
15	GKB	3000	8	+	- *	-	+			
16	GKB	3000	24	-	****	+	****			
17	GKB	6000	4	-	***	-	-	***	- *	-
18	GKB	6000	4	-	****	-	+			
19	GKB	6000	24	- ***	****	+	***			
20	GKB	12000	24	- **	****	+	***			
21	TEM	5	6	+	-	+	+	+	- *	-
22	TEM	10	6	-	+	+	-	-	****	-
23	TEM	20	6	+	- *	+	+	-	****	-
24	TEM	40	4	+	+	-	****	-	-	-
25	TEM	40	6	+	- *	+	-	-	- *	-
26	TEM	40	8	+	***	+	****	-	***	-
27	TEM	40	24	-	****	-	****			
28	TEM	80	6	+	***	+	-	-	+	-
29	Act.D.	0,6	4	-	- *	+	+			
30	Act.D.	1,2	4	-	-	-	***	-	+	- *

Tab. 31 : Relative Viskosität von DNA aus Milz und
===== Thymus von Mäusen 6 Std nach GKB oder i.v.
Injektion von TEM prozentual zu unbehandel-
ter DNA

Spalte A : TEM in mg/kg K.-Gew.

Spalte B : Relative Viskosität in Prozent

Spalte C : GKB in R

Spalte D : Relative Viskosität in Prozent

n = 4-8 Tiere

Zur Methode s. 3.6.1.

A	B	C	D
2,5	+10,0 $\pm$ 0,0	127	-21,0 $\pm$ 0,0
5,0	+ 2,0 $\pm$ 1,0	269	-29,0 $\pm$ 0,0
10,0	- 9,5 $\pm$ 0,5	510	-45,0 $\pm$ 0,0
20,0	-20,0 $\pm$ 3,0	1020	-45,5 $\pm$ 6,5

5. DISKUSSION

5.1. In vitro-Versuche

5.1.1. TB-Metachromasie: Spezifität

Ihrem Prinzip nach ist die Metachromasie kationischer Farbstoffe an anionischen Makromolekülen verhältnismäßig unspezifisch. Entsprechendes gilt auch für TB (3, 5, 12, 13, 14, 17, 18, 24, 27, 41, 44, 48, 77, 78, 87, 88, 97, 100, 117, 122, 123, 127, 139, 144, 145, 149, 170, 171, 174, 175, 176, 183, 204, 213). Werden metachromotrope Eigenschaften von N u c l e i n s ä u r e n gegenüber TB untersucht (7, 14, 18, 71, 77, 78, 87, 99, 100, 117, 127, 144, 145, 172, 173, 174, 192), erscheint die bei 555 nm erfaßbare negative Metachromasie von TB nur in Gegenwart von hochmolekularer DNA ausreichender Nativität bei wäßriger Lösung in Gegenwart von Protein (192, vorliegende Befunde). Im Hinblick auf das für die Reaktion optimale Farbstoff-Polyanionen-Konzentrationsverhältnis sowie das Verhältnis der Maximaextinktion von Farbstoff und metachromatischen Banden in Gegenwart von DNA unterschiedlicher Konzentration ergibt sich weitgehende Übereinstimmung mit früheren Versuchen (192) (s.4.1.1., Abb. 6-9).

5.1.2. TB-Metachromasie: Größe, Struktur und Konformation des Polyanions

Den bisherigen Ergebnissen zufolge kann die bei 555 nm in Gegenwart von DNA auftretende metachromatische Qualität von TB als Funktion räumlich geordneter, möglicherweise helikaler Strukturen aufgefaßt werden (192, vorl. Untersuchungen). Zu entsprechenden Schlüssen führten die Untersuchungen von SEMMEL et al. (172-174) an der RNA, soweit es sich hier um die bei 580 nm gemessene negative Metachromasie handelt. Reagiert TB in wäßriger Lösung mit Oligophosphaten entsprechend einer Kettenlänge von mehr als 7 Phosphatresten, läßt sich eine metachromatische Bande bei 525-545 nm nachweisen (123). Der Ver-

gleich der metachromotropen Eigenschaften von DNA und RNA zeigt aber, daß diese an Oligophosphaten durchgeführten Modellversuche nicht ohne weiteres auf Nucleinsäuren übertragen werden können. Ändert sich bei gleichem Polyanionen/TB-Verhältnis die Konformation des Nucleinsäure-Moleküls im Sinne einer Molekülverkleinerung oder einer Verminderung helikaler Strukturen, verändert sich auch die entsprechende metachromatische Qualität (100, 192). In diesem Sinne verhält sich die Metachromasie von TB an Nucleinsäuren gegenüber jeder Änderung von Bestandteilen des Reaktionsmilieus (3, 13, 48, 172-174, 192) sowie Änderungen des Nucleinsäure-Moleküls durch Hitze (18, 59, 76, 87, 173, 192), Ultraschall (18, 59, 192), UV-Licht (192), ionisierende Strahlen (192, vorl. Untersuchungen), DNasen (99, 192, vorl. Untersuchungen) oder Lost-Derivaten (192) unspezifisch.

5.1.3. TB-Metachromasie: Mechanismus

Die Mechanismen der Bildung des Farbstoff-Polyanionen-Komplexes sind zunächst allgemeiner Art und noch nicht in allen Einzelheiten bekannt (s.oben). MOSS et al. (127a) schränken die bei Kombination von TB mit röntgenbestrahlter Heringssperma-DNA auftretende metachromatische Qualität mit Absorptionsmaximum bei 595 nm auf die Reaktion des Farbstoffes mit freien 5'-PO₄-Enden ein: Das Absorptionsmaximum zeigte sich nach Bestrahlung mit UV-Licht oder nach Abbau der DNA an Micrococcal-Nuclease (letztere setzt 5'-OH- und 3'-PO₄-Enden frei) nicht, wohl aber nach Einwirkung von Pankreas-DNase (Freisetzung von 5'-PO₄- bzw. 3'-OH-Enden).

5.1.4. TB-Metachromasie: Empfindlichkeit gegenüber Konformationsänderungen des Polyanions

Wird die Metachromasie von TB an in Gegenwart von Protein wäßrig gelöster hochmolekularer DNA als Extinktions-Differenz zwischen 555-585 nm gemessen, lassen sich noch DNase I-Konzentrationen von 0,005 µg/ml ansatz erfassen (99, 192).

Enzymkonzentrationen von 0,9 $\mu\text{g}/1,0 \text{ ml}$ erbrachten vorliegend je nach Art des Substrats bereits eine Zunahme der Extinktionsdifferenz um 75-125 % (s.4.1.2.3.).

Die Empfindlichkeit gegenüber Denaturierung durch Hitze ist groß, da bereits eine Erhitzungsdauer von wenigen Sekunden sicher und schädigungsproportional nachgewiesen werden kann (192, 4.1.2.1.). Die Reaktionskinetik ist allerdings grundsätzlich verschieden von dem unter vergleichbaren Bedingungen im UV-Bereich gemessenen "Schmelzprofil" nativer DNA-Lösungen (121) und verweist auf den Modellcharakter der hier gewählten Reaktion.

Zu den empfindlichsten physikalischen Nachweismethoden von Strahlenschäden an der DNA gehört die Sedimentation im alkalisierten Saccharose-Gradienten (38, 137, 138, 140, 141, 160, 161). Strahlendosen von $> 100 \text{ Rad}$ werden dosisproportional erfaßt (Tab.H (141)).

Der Nachweis von Strahlenschäden an der DNA mithilfe der Metachromasie von TB konnte vorliegend in vitro aus der Zunahme der Extinktions-Differenz 555-585 nm dosisabhängig (s.4.1.2.4., Abb. 10-11) für Strahlendosen von 650-3900 Rad erbracht werden. Wird die dabei erhaltene (nicht-lineare Beziehung) in den Bereich kleinerer Strahlendosen interpoliert, ergibt sich eine mit jener der Sedimentation im alkalisierten Saccharose-Gradienten vergleichbare Empfindlichkeit (s.Tab.H). Entsprechendes gilt für den viskosimetrischen und chromatographischen Nachweis von Strahlenschaden (s. dazu 4.1.2.4. und 4.1.2.5. sowie Abb.12 und 13).

Als U r s a c h e der vorliegend metachromatisch, viskosimetrisch und saulenchromatographisch erfaßten strahlenchemischen Veränderungen an der DNA dürften in erster Linie Einzel- und Doppelstrangbrüche in Frage kommen (64, 69, 70, 81, 82, 101, 140, 161, 198, 208, 215). Sie verhalten sich - ihrem Umfang nach - dosisproportional (ibid.).

Tabb. F bis I : Zur Wirkung von ionisierende Strahlen auf DNA in-vivo und in-vitro
in Übersicht anhand neuerer Literatur

Präparate	System	Dosis	Methode	h	Veränderungen	Lit.
Milz und Thymus (Maus) Knochenmark (Ratte)	in-vivo	0-300 R	DPA-Reaktion	4	Erhöhung der DPN Ausbeute	178
Milz und Thymus (Maus+Ratte) Knochenmark (Ratte)	in-vivo	0-300 R > 300 R	DPA-Reaktion DPA-Reaktion	4 4	Erhöhung der DPN Ausbeute keine Veränderungen	177
Thymus (Mäuse und Ratten)	in-vivo	600-800 R	Sedimentation	0 6	keine Veränderungen DNA-Abbau, Doppelstrangbrüche	64
Milz, Thymus (Maus+Ratte) und Knochenmark (Ratte)	in-vivo	600 R	DPA-Reaktion Spektrophotometrie	4-6	Erhöhung der DPN Ausbeute	180
Thymus (Ratte)	in-vivo	600 R	Chromatographie Viskosimetrie Spektrophotometrie	4-6	Abbau und Denaturierung	79
Milz und Thymus (Maus)	in-vivo	600 R	Chromatographie	6	Solubilisierung eines Teiles des DNP-Komplexes	125
Thymus und Regenerierende Leber	in-vivo	700 R	Viskosimetrie	2-6	Labilisierung; Erhöhung der spezifischen Massen Aktivität im Zusammenhang mit zunehmender Labilität der DNS-Protein Bindung	58

Tab. 2 :

Präparate	System	Dosis	Methode	h	Veränderungen	Lit.
Thymus (Ratte)	In-vivo	800 R	Viskosimetrie	4	Abbau	61
Leber (Ratte)	In-vivo	300-900 R	Spektrophotometrie	-	Strangbrüche	45
Leber (Ratte)	In-vivo	900 R	Spektrophotometrie	-	Resistenz bestrahlter DNA gegen über Denaturierung durch DNase erhöht	47
Milz und Thymus (Ratte)	In-vivo	600-1000 R	Viskosimetrie Fällung mit Säure + Alkohol Gel-filtration	4	Molekulargewichtabfall	188
Milz und Thymus (Ratte) Niere (Ratte)	In-vivo	1000 R	Chromatographie Sedimentation	24	Abbau keine Veränderung	8
Thymus (Ratte)	In-vivo	1000 R	Viskosimetrie	-	Abbau Zellkernpyknose	63
Lymphoblasten (Kalb)	In-vivo	1000 R	Spektrophotometrie	-	Funktion der DNA als "Starter" für RNA-DNA Polymerase herab- gesetzt	68
Milz und Thymus (Ratte)	In-vivo	1000 R	DPA-Reaktion	24	Anstieg der Solubilisierbarkeit des DNA-Protein-Komplexes	28

Tab. II:
Literatur

Präparate	System	Dosis	Methode	h	Veränderungen	Lit.
Thymus (Maus)	in-vivo	200-3200R	Viskosimetrie Histologie	2-3	pyknotische Zellen Minuten nach GKB beobachtet; dosisabhängiger Abfall der Viskosität erst nach Latenzzeit von 2 Std	162
Lymphoma- Zellen (Ratte)	in-vitro	120-340 R	Spektrophotome- trie	-	Brüche	1
Zellkultur (Säugetier)	in-vitro	1000 R	Sedimentation	-	Einzelstrahlbrüche	141
Bakterio- phagen Øx174	in-vitro	1000 R	Denaturierung (Hitze)	-	Radikalbildung	15
Kalbthymus	in-vitro	1-10 Krad	Hohlelviskosime- trie	-	Einzelstrahlbrüche	70
Ehrlich- Asciites- Tumor (Maus)	in-vitro	1600 R	Viskosimetrie	-	Matrixverknäuelung der KNU- Polymerase herabgesetzt	111
	in-vitro	20 Krad	Viskosimetrie	-	DNA im Nucleosom herabgesetzt	111
Lymphknoten (Kalb)	in-vitro	28 Krad	Spektrophotome- trie Viskosimetrie	-	Brüche	196

Tab. I :

Präparate	System	Dosis	Methode	h	Veränderungen	Lit.
Leber (Ratte)	in-vitro	40 KR	Spektrophotometrie	-	DNA nach Bestrahlung in-vivo empfindlicher gegenüber Bestrahlung in-vitro	46
DNA (aus Forellen- sperma)	in-vitro	0-300 KR	Viskosimetrie Spektrophotometrie	-	Hemmung der indirekten Strahlenwirkung, wenn die DNA statt in Ag. dest. in NaCl gelöst wurde	155
Kalbsthymus	in-vitro	100-700KR	Chromatographie	-	Freisetzung von Nucleobasen und Nucleosiden	198

5.1.5. Reproduzierbarkeit der mithilfe der TB-Metachromasie nachgewiesenen Konformationsänderungen der DNA

Wurden metachromatisch nachweisbare Schäden an der DNA in vitro aus dem Verhalten der Extinktionsdifferenz 555-585 nm spektrophotometrisch erfaßt (s.4.1.2.), bestand zwischen den unter identischen Bedingungen (aber unabhängig voneinander) aufgearbeiteten Vergleichsproben praktisch kein quantifizierbarer Unterschied.

5.2. In vivo-Versuche

5.2.1. Zur Methode

- I. Die Identität der isolierten DNA-Proben ergab sich aus
- ihrem spektrophotometrischen Verhalten im UV-Bereich
 - ihrem Verhalten bei Chromatographie an DEAE-Cellulose-Säulen (Abb. 14-17)
 - dem positiven Ausfall der DISCHE-Reaktion
 - der Abbaubarkeit an DNase I (Abb. 11)
 - den metachromotropen Eigenschaften gegenüber TB (Abb. 8, 9)
 - dem Verhalten gegenüber denaturierenden Einflüssen (Abb. 8, 9, 11, 12, 14, 16, 17)

Den Proteinanalysen sowie dem Extinktionsverhältnis "240:260:280 nm" von Standard-DNA (66,0:100,0:59,3) und isolierter DNA (63,6:100,0:57,7) zufolge waren die Proteinbeimengungen gering. Sobald von der Zellkernfraktion ausgegangen wurde, vergrößerte sich die Proteinkonzentration der jeweiligen DNA-Lösung um durchschnittlich 37,5 (Thymus und Milz) bzw. 61,0% (Leber) auf 0,275 bzw. 0,322 µg/1,0 ml. Der viskosimetrische und säulenchromatographische Vergleich von Standard-DNA und isolierter DNA weist letzterer eher ein größeres Molekulargewicht als ca. 9.000.000 zu.

Wurden isolierte DNA-Proben in 0,4 M NaCl-Lösungen aufgenommen und anschließend hitzedenaturiert, ergab sich ein Hyper-

chromiezuwachs von durchschnittlich $28,4 \pm 14,8\%$ bei 260 nm ($n=12$). Dieser Befund belegt einen befriedigenden Nativitätsgrad (121).

Zusammenfassend betrachtet erfüllten die aus Leber bzw. Milz und Thymus isolierten DNA-Proben hinsichtlich Identität, Reinheit, Molekülgröße und Nativität somit die für die vorliegenden Versuche erforderlichen Voraussetzungen.

II. Das metachromotrope Verhalten der DNA-Proben aller Kontrollen war durch eine auffallend hohe Standardabweichung belastet (Tabb. B, D - Normalwerte). Entsprechendes gilt (bei Konstanz der TB-Konzentration) hinsichtlich der für das Reaktionsoptimum bei 555 nm erforderlichen DNA-Konzentration (Tabb. B,D). Eine wesentliche statistische Verbesserung des Analyseergebnisses war allerdings zu erreichen, sobald jeweils nur Kontrollen und Versuchsgruppen einer zusammengehörigen Analysenreihe miteinander verglichen wurden (Tabb. 1-9, 12, 17, 21-26, 28, 30).

4 Stunden nach Ganzkörperbestrahlung von Mäusen mit ca. 2000 Rad hatte sich die bei 555 nm gemessene metachromotrope Aktivität von Milz- und Thymus-DNA-Proben signifikant vermindert (Tab. 17). Viskosimetrisch (Tab. 31) und säulenchromatographisch (Abb. 14) waren unter den gleichen Bedingungen ca. 150 bzw. 300 Rad zu erfassen. Strahlendosen vergleichbarer Größenordnung wurden auch von anderen Autoren (Tab. H) an DNA-Fractionen aus Milz oder Thymus viskosimetrisch oder chromatographisch nachgewiesen. Uneinheitlicher und deutlich geringer waren die Veränderungen der DNA der Leber röntgenbestrahlter Mäuse (Tabb. 1-7).

Soweit es sich um DNA-Proben aus Milz und Thymus TEM-behandelter Mäuse handelt, bestehen hinsichtlich der Art der mit vorliegenden Methoden erfaßten Veränderungen qualitative Unterschiede (Tabb. 21-28; Abb. 15). Ein Methodenvergleich ist somit hier nicht oder nur bedingt möglich. Erste signifikant nachweisbare Normabweichungen ergaben sich an der DNA aus Milz und Thymus von Mäusen 4-6 Stunden nach

i.v. Injektion von TEM in Dosen von 2,5 (viskosimetrisch), 5,0 (TB-Metachromasie) bzw. 20 mg/kg K.-Gew. (Chromatographie an DEAE-Cellulose-Säulen). Die ersten der drei genannten TEM-Dosen entsprechen ca. der halben bzw. der einfachen DL 50/30 bei der Maus.

5.2.2. Zur Deutung der Befunde

5.2.2.1. Röntgenstrahlen

Zu den wesentlichsten biologischen Strahlenwirkungen gehört die unmittelbare und/oder mittelbare Schädigung von Strukturen und Funktionen des Zellkerns. Als Beleg für diese Aussage seien aus der kaum mehr übersehbaren Fülle von Publikationen die Arbeiten von BAUER et al. (8), COLE et al. (31), DERTINGER und JUNG (33), EBERT und HOWARD (36), FURNICA (45-47), GERBER und ALTMAN (51), HAGEN (63), HARRINGTON (68), HUTCHINSON und ARENA (75), HAGEN et al. (64), JANIK (79), KANAZIR (84), OKADA (136), PALCIC und SKARSGARD (140), SCHÄFER und HAGEN (162), STREFFER (186), TEMPEL (193) und TY-RAWSKA-SPYCHALOWA et al. (196) zitiert.

Die unmittelbar nach Bestrahlung einsetzende Labilisierung des Desoxyribonucleinproteinkomplexes im Zellkern (28, 30, 31, 57, 58, 61, 125, 177-180, 188, 189) ist sekundär und beruht unter anderem auf einer Schädigung des DNA-Anteils. Dieser wird - ähnlich wie in vitro (208)(s.Tab.1) sowie alle zu dieser Frage aufgenommenen Arbeiten z.B. 81, 82) vor allem (primär) von Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie von Schäden am Nucleotidrest betroffen (108, 109, 140, 141, 159). Die sich unmittelbar anschließenden weiteren Abbauvorgänge (31, 51, 57, 58, 63-64, 84, 133, 162, 177, 178, 180, 186, 188, 189, 193) sind enzymatischer Art und gehen unverzüglich in das Stadium der Nekrolyse über. Inwieweit daneben - vor allem in strahlenresistenteren Organen - mit dem Ablauf von Reperationsvorgängen zu rechnen ist, ist vorläufig nicht zu entscheiden. Immerhin ließen sich für zahlreiche Zellarten überraschend schnell ablau-

fende Reparationsarten nachweisen (9, 19, 38, 67, 85, 137, 138, 151, 152, 160, 181, 184, 212, 214).

Berücksichtigt man das bisher Gesagte, sind die vorliegend an der DNA aus Milz oder Thymus einige Stunden nach hochdosierter Ganzkörperbestrahlung metachromatisch, viskosimetrisch und säulenchromatographisch beobachteten Abbauvorgänge als sekundär anzusehen. Darüber hinaus sind sie als Bestätigung analoger Befunde anderer Autoren (Tabb. F, G) zu werten.

Der Vergleich des metachromotropen Verhaltens von DNA aus zellkernhaltigen Homogenaten und Zellkernfraktionen der Leber hochdosiert bestrahlter Mäuse sowie der phasenartige Verlauf der Veränderungen könnten als Ausdruck zeit- und dosisabhängig miteinander konkurrierender Abbau- und Reparationsvorgänge verstanden werden und bedürfen weiterer Überprüfung. STRAZHEVSKAYA und STRUCHOV beispielsweise erwähnen, daß DNA-Strangbrüche (185) in der Heterochromatin-Region von Chromosomen der Leber 6 Stunden nach Bestrahlung mit 100 R wiederhergestellt waren, während sich im Thymus keinerlei Anhaltspunkte für einen entsprechend ablaufenden Reparationsvorgang ergaben.

Soweit Veränderungen an aus strahlenresistenten Organen isolierten DNA-Proben nachgewiesen werden (51), betreffen sie weniger den DNA-Anteil als den DNA-Protein-Komplex in seiner Gesamtheit (s.oben). FURNICA (45) verweist auf erhöhte Hitze-resistenz von DNA-Proben aus der Leber von Ratten 10 Tage nach Ganzkörperbestrahlung mit letalen und subletalen Dosen. Die vorliegend durchgeführten metachromatischen Analysen an DNA-Proben aus Leber sowie Milz und Thymus (Abb. 8, 9, 11) ergaben keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich Denaturierung durch Hitze oder Abbau an DNase I zwischen Kontrollen und bestrahlten Mäusen (51a).

5.2.2.2. Biologische Alkylantien

(l.c. 120, 187, 202)

In vitro und In vivo-Befunde stützen die Annahme (6, 20, 43, 107, 116, 118, 126, 131, 156), daß die zelluläre Wirkung von biologischen Alkylantien unter anderem auf Alkylierungsvorgängen am DNA-Protein-Komplex des Zellkerns beruht. Die sich anschließenden Abbauvorgänge (124, 193, 197, 198, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000) können als Bestandteil nekrolytischer (193) und/oder reparativer Vorgänge (151, 152, 214) angesehen werden.

Dominiert der Vorgang der Alkylierung (denkbar: Unmittelbar nach Applikation extrem hoher Dosen - Milz und Thymus, Tab. 28, 30 sowie Gewebe i n i t i a l geringer nucleolytischer Aktivität, hier: Leber, Tab. 12), ist zumindest vorübergehend über Vernetzungseffekte an DNA-Strukturen höherer Resistenz oder Ordnung zu rechnen. Von hier aus ist die erhöhte metachromatische Aktivität der DNA-Proben aus Leber sowie Milz und Thymus 4-6 Stunden nach i.v. Injektion von 40 bzw. 80 mg TEM/kg K.-Gew. von besonderem Interesse (Tab. 8-10, 24-28). Entsprechendes gilt sinngemäß auch für die Wirkung von Actinomycin D (Tab. 11, 12, 29, 30) sowie das viskosimetrische Verhalten der DNA aus Milz und Thymus TEM-behandelter Mäuse (Tab. 31).

Aus dem Eluierungsmuster einer an DEAE-Cellulose-Säulen adsorbierten DNA-Fraktion aus den gleichen Organen der Maus 6 Stunden nach i.v. Injektion von TEM 20 mg/kg K.-Gew. sind unmittelbar Bestandteile niedrigeren und solche höheren Molekulargewichts ableitbar. Gegenüber der Vergleichsanalyse strahlengeschädigter DNA besteht damit ein wesentlicher Unterschied.

Tabbe J und K : Zur Wirkung einiger Radiomimetika auf DNA in-vivo und in-vitro
in Übersicht anhand neuerer Literatur

Präparate	System	Dosis	Methode	h	Veränderungen	Lit.
Milz und Thymus (Maus)	in-vivo	Degranol 1.p. 0,2-2,0mg/10g Endoxan 1.p. 2,5-5,0mg/10g NS 160 1.p. 0,06mg/10g, 2mg; 0,4mg/10g Xpenty 1.p. 0,1;0,15;0,2; 0,4mg/10g Mylecyan 1,5mg/100g	Spektropho- tometrie	8-10	Bei Degranol (Dosis ent- sprechend LD ₅₀) DNA in Milz und Thy- mus am stärksten erhöht. Die übrigen Cytostatika waren weniger wirkungsvoll.	124
Ehrlich- Ascites- Tumor (Maus)	in-vivo	Stickstoff- lost 3,0mg/kg	Spektropho- tometrie Viskosime- trie Sedimenta- tion	1/2	keine	55
Hühner- embryo	in-vivo	Mitomycin C Thio-TMPA 10-100 bzw. 50 µg/Ei	DPA-Reaktion	>6	Mitomycin C: cross-linkage; Mitomycin C und Thio-TMPA: DNA-Synthese vor RNA- und Protein-Synthese gestört	126
Ehrlich- Ascites- Tumor (Maus)	in-vivo	Trenimon 5x10 ⁻⁵ -1x10 ⁻⁴ M	Spektropho- tometrie	-	Hemmung der DNA und RNA Synthese	74
Ehrlich- Ascites- Tumor (Maus)	in-vivo	Trenimon 1.p. 0,2 µg/g	DPA-Reaktion	6-12	Am empfindlichsten: Thymidin-einbau in DNA	114

Tab. K :

Präparate	System	Dosis	Methode	h	Veränderungen	Lit.
Ehrlich- Ascites- Tumor	In-vivo	Trenimon 0,33-2,00g/ml	Spektropho- tometrie	2	Hemmung der RNA- Synthese	112
Leber und jensen-Sar- koma-Zellen (Ratte)	In-vivo	Bayer E 39 4,8mg/kg i.v.	Stickstoff- Phosphor Verhältnis	-	Abfall des Phosphorgehaltes; Stickstoffgehalt unverändert	135
HeLa-Zellen (Säugetier)	In-vitro	Dichlorodl- äthyl-sulfid	Spektropho- tometrie	7,5	"Interstrand cross-links"	6
DNA (aus Hering - sperma)	In-vitro	1-Bayer E 39 10g/mg * 2-Trenimon 0,2mg * 3-Vinocolevko- blastine 5,0mg * 4-Dichlororen 10,0mg * 5-Thio-TEPA 10,0mg * 6-Bayer 3375 100,0mg * 7-Endoxan 100,0mg * 8-Bronate 100,0mg * 9-TEM 2,0mg * 10-Myletan 2,0 mg *	Sedimentation	-	1-3 Wirkungslos 4-8 Desaggregation 9 Schwere Molekülaggregate 10 Schwere und leichtere Molekülaggregate	91

*) mg/10 ml 1%ige DNA- Lösung

6.

Z U S A M M E N F A S S U N G

DNA-Proben wurden nach Röntgenbestrahlung in wäßriger Lösung sowie nach Isolierung aus Milz, Thymus und Leber von Mäusen 0-24 Std nach Ganzkörper-Röntgenbestrahlung (GKB) mit 150-4000 Rad, einmaliger i.v. Injektion von 5-80 mg TEM oder 0,6-1,2 mg Actinomycin D pro kg K.-Gew. metachromatisch, viskosimetrisch und säulenchromatographisch untersucht. Die wesentlichsten Ergebnisse lauten wie folgt:

1. In Gegenwart von DNA und Protein zeigen wäßrige Lösungen von Toluidinblau (TB) negative Metachromasie mit Absorptionsmaximum bei 555 nm. Werden DNA-Lösungen durch Hitze (90°C: 5-40 sec), Röntgenstrahlen (120-5200 Rad) oder DNase I (0,9-90 µg/ml Ansatz) denaturiert, vermindert sich die bei 555 nm gemessene metachromatische Aktivität gegenüber TB proportional am Denaturierungsgrad.

Der bei Strahlenwirkung erfolgende DNA-Abbau wurde viskosimetrisch und durch Chromatographie an DEAE-Cellulose-Säulen bestätigt.

2. Wurden Mäuse hochdosiert röntgenbestrahlt, verminderte sich das relative Frischgewicht von Milz und Thymus bereits wenige Stunden nach Versuchsbeginn zeit- und dosisabhängig. Zu vergleichbaren Veränderungen führten TEM und Actinomycin D in Dosen von >20 mg bzw. 0,6 mg/kg.
3. Die DNA-Ausbeute aus Milz und Thymus erhöhte sich 24 Std nach hochdosierter GKB und 8 Std nach i.v. Injektion von 40 mg TEM/kg signifikant. Verminderte Ausbeuten ergaben sich unter dem Einfluß von TEM 4 und 24 Std nach Versuchsbeginn.
4. 4-6 Std nach GKB von Mäusen mit 2000 Rad oder i.v. Injektion von 5-20 mg TEM/kg hatte sich die bei 555 nm gemessene metachromatische Aktivität von Milz- und Thymus-DNA gegenüber den Kontrollen signifikant vermindert. Säulenchromatographisch ließen sich unter den gleichen Be-

dingungen Dosen von 600-1200 Rad bzw. 10-20 mg/kg, viskosimetrisch solche von 127-1020 Rad bzw. 10 mg/kg erfassen.

5. Die Ergebnisse an Leber-DNA waren uneinheitlicher. Wurden die DNA-Proben aus den Homogenaten isoliert, war ihre bei 555 nm gemessene metachromatische Aktivität unmittelbar sowie 4 Std nach hochdosierter GKB vermindert. Verstärkte Aktivitäten zeigten DNA-Präparationen unter den gleichen Bedingungen 2,8. und 24 Std p. irr. sowie nach Isolierung aus der Zellkernfraktion unter dem Einfluß von TEM und Actinomycin D.

Chromatographische Veränderungen ergaben sich erst nach Strahlendosen von mindestens 1200 Rad.

6. Hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Denaturierung durch Hitze oder DNase I ließen DNA-Proben nach Isolierung aus Organen bestrahlter oder mit TEM behandelter Mäuse keine metachromatisch oder UV-spektrophotometrisch nachweisbaren Veränderungen erkennen.

7: Schlußfolgerungen:

- a. Unter In vitro-Bedingungen kann die metachromatische Aktivität von DNA gegenüber TB zwar als unspezifischer, aber als empfindlicher, einfacher und rascher Nachweis von Strahlenschäden herangezogen werden.
- b. Sollen DNA-Präparationen nach Schädigung in vivo überprüft werden, ist die Methode der TB-Metachromasie durch zusätzliche Meßverfahren zu ergänzen.
- c. Mit diesen Einschränkungen verweisen die vorliegend an DNA-Proben aus Milz und Thymus von Mäusen nach Schädigung durch GKB oder TEM erhaltenen Ergebnisse auf rasch einsetzende Abbauvorgänge.
- d. In der Leber ist mit Reparationsvorgängen zu rechnen.
- e. Für TEM deuten sich Vernetzungseffekte gegenüber der DNA in vivo sowohl metachromatisch als auch chromatographisch an.

S U M M A R Y

Irradiated DNA samples in aqueous solutions as well as after isolation - 0-24 h after treatment - from the spleen, thymus and liver of mice were examined by metachromasy, viscosimetry and column fractionation. Before the isolation, the mice were either whole-body irradiated with 150-4000 rad or treated with a single i.v. injection of TEM or Actinomycin D, 5-80 mg and 0,6-1,2 mg/kg body-weight respectively.

The most essential results are as follows:

1. In the presence of DNA and protein, aqueous toluidine blue solutions show negative metachromasy with a maximum absorption at 555 nm. When the DNA solutions are denaturated by heat (90°C: 5-40 sec), X-irradiation (120-5200 rad) or DNase I (0,9-90 µg/ml), the metachromatic activity measured at 555 nm declines proportional with the degree of denaturation. The irradiation-caused DNA-decomposition was varified by means of viscosimetry and column fractionation on DEAE-cellulose.
2. The relative fresh-weight of spleen and thymus declined following high irradiation doses depending on time and doses, and this was seen as early as a few hours after the beginning of the experiment. TEM and Actinomycin D lead to comparable changes when applied in doses of >20 and 0,6 mg/kg respectively.
3. The DNA yield showed a significant increase 24 h after high doses of irradiation and 8 h after 40 mg/kg TEM. 4 and 24 h after TEM injection the yield decreased.
4. The metachromatic activity of spleen and thymus DNA, measured at 555 nm, showed a significant decrease 4-6 h after whole-body irradiation with 2000 rad or after TEM i.v., 5-20 mg/kg. Under the above conditions, doses of 600-1200 rad and 10-20 mg were verified by column fractionation chromatography, those of 127-1020 rad and 10 mg by viscosimetry.

5. The results obtained from investigations on the liver DNA were not as consistent. When the isolation of DNA samples - immediately and 4 h after high doses of whole-body irradiation - was from homogenates, the metachromatic activity measured at 555 nm decreased. DNA samples showed increased activity under the same conditions 2, 8 and 24 h after irradiation as well as after the isolation from the cell-nuclei-fraction under the influence of TEM and Actinomycin D. Chromatographic changes were obtained only after radiation doses of at least 1200 rad.
6. The DNA samples, isolated from organs of irradiated or TEM treated mice, were also studied after denaturation by heat or DNase I. They revealed no metachromatic or UV-spectrophotometric changes.
7. Conclusions:
 - a. Under in vitro conditions one may consider the metachromatic activity of DNA on TB as an unspecific but at the same time a sensitive, simple and quick test for radiation damage.
 - b. When DNA samples - damaged in vivo - are to be examined, the TB metachromasy is to be supplemented with additional methods.
 - c. With these limitations, the above results on DNA samples from spleen and thymus of mice after damage caused by whole-body irradiation or TEM, show rapidly starting decomposition processes.
 - d. Reparation processes are to be assumed in the liver.
 - e. Metachromatic and column fractionation studies allow the assumption that DNA, under the influence of TEM in vivo, shows cross-linkage.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ALEXANDER, P.:
Comparison of the mode of action by which some alkylating agents and ionizing radiations kill mammalian cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 163, 652-675 (1969)
2. ARNOLD, H.:
Einführung in die Chemie der Zytostatika.
Strahlentherapie 119, 147-151 (1962)
3. ARNOLD, M.:
Investigation of models for the analysis of metachromatic substances.
Histochemie 6, 1-7 (1966)
4. BACQ, Z.M. und ALEXANDER, P.:
Grundlagen der Strahlenbiologie.
Stuttgart : Thieme 1958
5. BALAZS, E.A., DAVIES, J.V., PHILLIPS, G.O., and SCHEUFELE, D.S.:
A study of polyanion-cation interactions using hydrated electrons.
Biochem. biophys. Res. Commun. 30, 386-392 (1968)
6. BALL, C.R., and ROBERTS, J.J.:
Estimation of interstrand DNA cross-linking resulting from mustard gas alkylation of HeLa cells.
Chem. Biol. Interactions 4, 297-303 (1971)
7. BAUER, K.:
Die Chromatographie von Proteinen und Nucleinsäuren auf Papier und Dünnschichten.
J. Chromatog. 32, 529-542 (1968)
8. BAUER, R.D., LORING, W., and KURNICK, N.B.:
Studies of DNA of irradiation-damaged nucleoprotein.
Radiat. Res. 26, 507-517 (1965)
9. BEERS, R.F., HERRIOTT, R.M., and TILGHMAN, R.C.:
Molecular and cellular repair processes.
Baltimore : John Hopkins Press 1972

10. BEISENHERZ, G., BOLTZE, H.J., BÜCHER, T., CZOK, R., GARBADE, K.J., MEYER-ARENDT, E. und PFLEIDERER, R.:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforschg. 8b, 555 (1953)

11. BERENBOM, M.C.:
Histochemical evidence for cross-linking of DNA by alkylating agents in vivo.
Biochem. Pharmacol. 11, 1035 (1962)

12. BIDEGARAY, J.P., et VIOVY, R.:
Relations entre les phénomènes d'association en solution et la métachromasie: Cas du bleu de Toluidine.
I. Généralités et étude des solutions de bleu de Toluidine.
J. Chim. phys. 61, 1383-1390 (1964)

13. BIDEGARAY, J.P., et VIOVY, R.:
Relations entre les phénomènes d'association en solutions et la métachromasie: Cas du bleu de Toluidine.
II. Etude de la métachromasie de bleu de Toluidine.
J. Chim. phys. 61, 1391-1399 (1964)

14. BILLER, S., and BOTIS, S.:
Investigations on the interactions between DNA and some cationic dyes.
Roum. d'Inframicrobiol. 6, 233-240 (1969)

15. BLOK, J., and VERHEY, V.S.D.:
The attack of free radicals on biologically active DNA in irradiated aqueous solutions.
Radiat. Res. 34, 689-703 (1968)

16. BOHACEK, J., and BLAZICEK, G.:
On the course of thermal denaturation of deoxyribonucleic acids after γ -irradiation.
Biophysik 2, 233-238 (1965)

17. BOLCATO, V., and SPETTOLI, P.:
Dextran sulfate-toluidin blue method for the histochemical identification of lipoproteins in cheese.
J. Dairy Res. 36, 125-127 (1969)

18. BRAGINSKAYA, F.I., and ELPINER, I.E.:
Metachromasia of nucleic acids, native and irradiated by ultrasound.
Biofizika 2, 40-47 (1964)
19. BRENT, T.P., and WHEATLEY, G.A.:
Repair and replication of X-irradiated HeLa cell DNA.
Int. J. Radiat. Biol. 19, 339-348 (1971)
20. BROOKES, P.:
Interaction of carcinogens with DNA.
Biochem. Pharmacol. 20, 999-1003 (1971)
21. BROOKES, P., and LAWLEY, P.D.:
The reaction of mono- and difunctional alkylating agents with nucleic acids.
Biochem. J. 80, 496 (1961)
22. BURTON, K.:
A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA.
Biochem. J. 62, 315-323 (1956)
23. BUTLER, J.A.V.:
Effects of X-rays and radiomimetic agents on nucleic acids and nucleoproteins.
p. 59 in: Ciba foundation symposium in ionizing radiations and cell metabolism. WOLSTENHOLME, G.E.W., and O'CONNOR, C.M. (eds.)
London :Churchill 1956
24. BYFIELD, J.E., LEE, Y.C., and BEBBETT, L.R.:
Bonding of small molecules to DNA.
Nature (Lond.) 225, 859-860 (1970)
25. CATTAN, D., BOURGOIN, D., and JOLY, M.:
Change of conformation of DNA by association with proteins.
European J. Biochem. 8, 541-546 (1969)
26. CAVALLI-SFORZA, L.:
Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
Stuttgart : Fischer 1969

27. CHAYEN, R., and ROBERTS, E.R.:
The metachromatic reaction.
Sci. J. Roy. Coll. Sci. 25, 50-56 (1955)
28. CHLUMECKÁ, V., and SKALKA, M.:
Solubilization of rat thymus and spleen deoxyribo-
nucleoprotein in neutral salt solutions after irra-
diation in vivo.
Fol. Biol. 12, 374-381 (1966)
29. CHUN, L., JONES, J.W., and RUTMAN, R.J.:
In vivo-alkylation of Ehrlich ascites DNA by HN2.
Fed. Proc. 24, Nr. 2258 (1965)
30. COGGLE, J.E.:
Biological effects of radiation.
London and Winchester : Wykeman Publ. 1971
31. COLE, A., CORRY, P.M., and LANGLEY, R.:
Effects of radiation and other agents on the mole-
cular structure and organization of the chromosome.
Genetic Concepts and Neoplasia, pp. 346-379
Baltimore, Maryland : Williams and Wilkins 1970
32. DEPUY, C.H., and RINEHART, K.L.jr, editors
Introduction to organic chemistry.
New York, London, Sidney : Wiley and Sons 1967
33. DERTINGER, H. und JUNG, H.:
Molekulare Strahlenbiologie.
Berlin, Heidelberg, New York : Springer 1969
34. DESSAUER, F.:
Quantenbiologie.
Berlin, Göttingen, Heidelberg : Springer 1954
35. DUSTIN, F.:
Some new aspects of mitotic poisoning.
Nature (Lond.) 159, 794 (1947)
36. EBERT, M., and HOWARD, A.:
Some recent studies in molecular radiobiology.
Curr. Top. Radiat. Res. 2, 1-38 (1969)

37. EDWARDS, P.A., and SHOOTER, K.V.:
Sedimentation characteristics of DNA multiply cross-linked by a difunctional alkylating agent, mustard gas.
Biopolymers 10, 2079-2082 (1971)
38. ELKIND, M.M., and CHIN-MEI CHANG-LIU:
Repair of a DNA complex from X-irradiated Chinese hamster cells.
Int. J. Radiat. Biol. 22, 75-90 (1972)
39. ELSON, L.A.:
Radiation and radiomimetic chemicals.
Comparative physiological effects.
Cancer monograph series.
Washington : Butterworths 1963
40. EMMELOT, P.:
The molecular basis of cancer chemotherapy.
p. 55 in: Molecular Pharmacology. ARIENS, J.E. (ed.)
Vol. II, New York and London : Academic Press 1964
41. FEDER, N., and WOLF, M.K.:
Studies on nucleic acid metachromasy. II. Metachromatic and orthochromatic staining by toluidine blue of nucleic acids in tissue sections.
J. Cell. Biol. 27, 327-336 (1965)
42. FEINE, V.:
Radiomimetische Stoffe. pp. 9-13 in: Strahlenbiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Krebsforschung.
Hrsg. von SCHINZ, H.R., HOLTHUSEN, H., LANGENDORFF, H., RAJEWSKY, B. und SCHUBERT, G.. Ergebnisse 1952-1958
Stuttgart : Thieme 1959
43. FLAMM, W.G., BERNHEIM, N.G., and FISHBEIN, L.:
On the existence of interstrand crosslinks in DNA alkylated with sulfur mustard.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 224, 657-659 (1970)
44. FRANZ, H., SCHEUNER, G. und HUTSCHENREITER, J.:
Modellversuche zur Ursache der Toluidinblau-metachromasie.
Acta histochem. 41, 120-124 (1971)

45. FURNICA, M.:
DNA spectrophotometric characterization after irradiation in vivo. II. Thermic transition and influence exerted by radioprotective (AET) and radiosensitizing (cocarboxylase) substances.
Rev. Roum. Biochim. 5, 113-120 (1968)
46. FURNICA, M.:
DNA spectrophotometric characterization after irradiation in vivo. III. Influence of irradiation in vitro on the behaviour toward denaturing agents of DNA extracted from normal or irradiated animals.
Rev. Roum. Biochim. 5, 199-208 (1968)
47. FURNICA, M.:
DNA spectrophotometric characterization after irradiation in vivo. IV. The deoxyribonuclease action on DNA extracted from normal or irradiated animals.
St. Cerc. Biochim. 11, 261-268 (1968)
48. FUSE, Y., MIYAKI, K., and TSUBOI, M.:
Bull. Chem. Soc. Japan 38, 1039-1040 (1965)
zitiert nach TEMPEL, K.
Zur Metachromasie von Toluidinblau in Gegenwart von Nucleinsäuren.
Z. Naturforschg. 24b, 1279-1283 (1969)
49. GALE, E.F., CUNDLIFFE, E., REYNOLDS, P.E., RICHMOND, M.H., and WARING, M.J.:
Inhibitors of nucleic acid synthesis.
pp. 173-277 in: The molecular basis of antibiotic action.
London, New York, Sidney, Toronto : Wiley and Sons 1972
50. GEIDENSCHKE, E.P.:
Reversible DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47, 950 (1961)
51. GERBER, G.B., and ALTMANN, K.J.:
Lymphoid organs.
pp. 49-79 in: Radiation biochemistry. Vol. II "Tissues and body fluids", ALTMANN, K.J., GERBER, G.B., and OKADA, S. (eds.)
New York, London : Acad. Press 1970

- 51a. GERBER, G.B., and ALTMANN, K.J.:
The liver.
pp. 102-194 in: Radiation biochemistry. Vol. II "Tissues and body fluids", ALTMANN, K.J., GERBER, G.B., and OKADA, S. (eds.)
New York, London : Acad. Press 1970
52. GINOZA, W., and ZIMM, B.H.:
Mechanisms of inactivation of deoxyribonucleic acid by heat.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 47, 639 (1961)
53. GOLDBERG, I.H.:
Interaction of Actinomycin with DNA.
Antibiotic. Chemother. (Basel) 17, 67-86 (1971)
54. GOLDBERG, I.H., and FRIEDMAN, P.A.:
Antibiotics and nucleic acids.
Amer. Rev. Biochem. 40, 775-810 (1971)
55. GOLDER, R.H., MARTIN-GUZMAN, G., JONES, J., GOLDSTEIN, N.O., ROTENBERG, S., and RUTMAN, R.J.:
Experimental chemotherapy studies. III. Properties of DNA from ascites cells treated in vivo with nitrogen mustard.
Cancer Res. 24, 964-968 (1964)
56. GOLDWAITH, D.A., and KERR, D.S.:
Studies on the chromatographic properties of amino acid transfer and ribosomal RNA.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 61, 930 (1962)
57. GOUTIER, R.:
Effects of X-ray on nucleic acid biosynthesis and on the activity of nucleases in mammalian cells.
Progr. Biophys. 11, 54 (1961)
58. GOUTIER, R., GOUTIER-PIROTE, M., and RAFFI, A.:
Acid deoxyribonuclease activity and labilization of deoxyribonucleic acid from nucleoprotein in thymus and regenerating liver after wholebody irradiation.
Int. J. Radiat. Biol. 8, 51 (1964)
59. GROSSMAN, L., STOLLAR, D., and HERRINGTON, K.:
Some aspects of the structure of heat denatured and ultraviolet irradiated DNA. p.200 in: Deoxyribonucleic acid.
Oxford, London, New York, Paris : Pergamon Press 1962

60. GRUNICKE, H., ZIMMERMANN, F., and HOLZER, H.:
The effects of alkylating cytostatic agent, 2,3,5-trisethylene-imino-benzoquinone-1,4 (Trenimon), on the priming ability of DNA from mouse-ascites-tumor cells in the RNA-polymerase-system.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 319 (1965)
61. HAGEN, U.:
Labilization of deoxyribonucleic acid in thymus nucleoprotein after wholebody irradiation.
Nature (Lond.) 187, 1123-1127 (1960)
62. HAGEN, U.:
Viskosität der Thymus-Desoxyribonukleinsäure in röntgenbestrahlten Ratten.
Naturwiss. 47, 601-603 (1960)
63. HAGEN, U.:
Untersuchungen über die Entstehung der Thymusatrophie nach Röntgenbestrahlung. II. Das Schicksal der Desoxyribonukleinsäure.
Strahlentherapie 116, 385-394 (1961)
64. HAGEN, U., KECK, K., ZIMMERMANN, F. und KRÖGER, H.:
Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonukleinsäure. IV. Strahlenschaden am DNS-Molekül in der bestrahlten Zelle.
Strahlentherapie 132, 1-11 (1967)
65. HAGEN, U., ULLRICH, M., and JUNG, H.:
Transcription on irradiated DNA.
Int. J. Radiat. Biol. 16, 597-601 (1969)
66. HAGEN, U. und WELLSTEIN, H.:
Strahlentherapie 128, 565 (1965)
zitiert nach ULLRICH, M. und HAGEN, U.
Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken in der Desoxyribonukleinsäure.
Z. Naturforschg. 23b, 1176-1183 (1968)
67. HANAWALT, P.C.:
Repair replication of damaged DNA in vivo.
Sym. Fundam. Cancer Res. 23, 528-547 (1971)
68. HARRINGTON, H.:
Effect of X-irradiation on the priming activity of DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 59-66 (1964)

69. HARRINGTON, H., and RICANATI, M.:
Effects of various agents on the priming activity of
DNA for *Escherichia coli* DNA polymerase.
J. Mol. Biol. 15, 152-159 (1966)

70. HARTWIG, M.:
Strahleninduzierte Veränderungen an isolierter DNS
und deren funktionelle Konsequenzen. XIII. Zum vis-
kosimetrischen Schmelzverhalten bestrahlter DNS.
Stud. biophys. (Berlin) 27, 29-36 (1971)

71. HENGLEIN, A., and SCHNABEL, W.:
Curr. Top. Radiat. Res. 2, 1 (1966)
zitiert nach DERTINGER, H. und JUNG, H.
Molekulare Strahlenbiologie.
Berlin, Heidelberg, New York : Springer 1969

72. HERSHEY, A.D., and BURGI, E.:
Molecular homogeneity of the deoxyribonucleic acid of
phage T2.
J. Mol. Biol. 2, 143 (1960)

73. HILZ, H., HUBMANN, B., OLDEHOP, M., SCHOLZ, M. und
GOSSLER, M.:
Die Wirkung von Röntgenstrahlen und cytostatischen
Verbindungen auf DPN-Gehalt und DNS-Synthese in As-
citestumorzellen.
Biochem Z. 336, 62-76 (1962)

74. HÖLZEL, F., PFLÜGER, P., BARTH, O. und MAASS, H.:
Die Hemmung der DNS- und der RNS-Synthese in Ehrlich-
Ascitestumorzellen durch Trenimon.
Z. Krebsforschg. 66, 559-573 (1965)

75. HUTCHINSON, F., and ARENA, J.:
Destruction of the activity of deoxyribonucleic acid
in irradiated cells.
Radiat. Res. 13, 137-147 (1960)

76. HUTSCHENREITER, J., FRANY, H., and SCHEUNER, G.:
Effect of temperature on toluidine blue metachromasy
utilizing Sephadex cation exchanges . Modeltest.
Expl. Path. 6, 111-115 (1972)

77. ITZHAKI, R.F.:
Binding of polylysine and toluidine blue to deoxy-
ribonucleoprotein.
Biochem. J. 121, 25- 26 (1971)

78. ITZHAKI, R.F.:
Studies on the accessibility of deoxyribonucleic acid
in deoxyribonucleoprotein to cationic molecules.
Biochem. J. 122, 583-592 (1971)
79. JANIK, B.:
Contribution to the study of DNA from irradiated tissues.
Fol. Biol. (Praha) 12, 189-198 (1966)
80. JOLY, M.:
Remarques sur les associations acide désoxyribonucléique-
sérum albumine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 49, 205-220 (1967)
81. JUNG, H., HAGEN, U., ULLRICH, M. und PETERSEN, E.E.:
Structural and functional changes in DNA after exposure
to hydrogen atoms and gamma radiation.
Z. Naturforschg. 24b, 1565-1573 (1969)
82. JUNG, H., ULLRICH, M., KRÜGER, H., PETERSEN, E. und
HAGEN, U.:
Structural and functional changes in irradiated DNA.
pp. 199-206 in: Biophysical aspects of radiation
quality.
Vienna : Int. Atomic Energy Agency 1971
83. KAMORSKY, D.A., and CLARKSON, B.D.:
Cellular effects of anticancer drugs.
p. 357 in: Annual reviews of pharmacology, CUTTING, W.C.,
(ed.), Vol.III
Palo Alto, California : Annual reviews, Inc. 1963
84. KANAZIR, D.T.:
Radiation-induced alterations in the structure of deoxy-
ribonucleic acid and their biological consequences.
pp. 117-222 in: Progress in nucleic acid research and
molecular biology. Vol. IX, DAVIDSON, J.N., and COHN, M.E.,
(eds.)
New York, London : Academic Press 1969
85. KAPLAN, H.S.:
Enzymatic repair of radiation-induced strand breakage
in cellular DNA and its chemical inhibition.
Radiology 105, 121-126 (1972)

86. KARLSON, P.:
Nucleinsäuren und Proteinbiosynthese.
p.100 in: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner
und Naturwissenschaftler.
Stuttgart : Thieme 1972
87. KELLY, J.W., CHANG, L., and ROTHSTEIN, F.:
Thermal analysis of polyanion metachromasy: Effect of
temperature on metachromatic solutions of nucleic
acids and acid mucosaccharides.
J. Histochem. Cytochem. 17, 651-657 (1969)
88. KIESER, E.:
Studies on the metachromatic effect of toluidine blue
and sodium hydroxide.
Acta Histochem. 32, 135-141 (1969)
89. KLEIMAN, L., and HUANG, R.C.C.:
Binding of Actinomycin D to calf thymus chromatin.
J. Mol. Biol. 55, 503-521 (1971)
90. KLEINWÄCHTER, V.:
Stud. biophys. 3, 105 (1967)
zitiert nach LÖBER, G.
Zur Komplexbildung von Farbstoffen mit Desoxyribonu-
cleinsäuren.
Z. Chemie 9, 252-265 (1969)
91. KLEMM, D. und OBRECHT, P.:
Die Wirkung verschiedener Cytostatika auf das Ultra-
zentrifugendiagramm der Desoxyribonucleinsäure.
Arzneimittel-Forschg. 12, 468-469 (1962)
92. KLINGMÜLLER, W.:
Molekulargenetik.
Naturwiss. Rundschau 15, 363-373 (1962)
93. KOHN, K.W., SPEARS, C.L., and DOTY, P.:
Interstrand crosslinking of DNA by nitrogen mustard.
Appendix: Terminology of configurational changes of
DNA in solution.
J. Mol. Biol. 19, 266 (1966)
94. KOLLER, P.C.:
Comparative effects of alkylating agents on cellular
morphology.
Progr. Biophys. 4, 195 (1954)

95. KOLLER, P.C.:
Comparative effects of alkylating agents in cellular morphology.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 783 (1957/58)
96. KOLLER, P.C., and CASARINI, A.:
Comparison of cytological effects induced by X-rays and nitrogen mustard.
Brit. J. Cancer 6, 173 (1952)
97. KRYGIER, A., and KASPRZYK, K.:
The influence of hydrogen-ion concentrations and some other ions on metachromasy on staining mucopolysaccharides with toluidine blue.
Acta Med. Pol. 2, 123-145 (1961)
98. KUMMER, D. und OCHS, H.D.:
Differenzierung der Wirkungsmechanismen alkylierender Cytostatika an Ehrlich-Ascitescarcinom- und lymphatischen Leukämiezellen.
Z. Krebsforsch. 73, 315- 328 (1970)
99. LACHICA, V.F., GENIGEORGIS, C., and HOEPRICH, P.D.:
Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity.
Appl. Microb. 21, 585-587 (1971)
100. LAMM, M.E., CHILDERS, L., and WOLF, M.K.:
Studies on nucleic acid metachromasy. I. The effect of certain fixatives in the dye stocking properties of nucleic acids in solution.
J. Cell Biol. 27, 313-326 (1965)
101. LATARJET, R.:
Interaction of radiation energy with nucleic acids.
Curr. Top. Radiat. Res. Quart. 8, 1-38 (1972)
102. LAUBER, K.:
Chemie im medizinischen Laboratorium. pp. 145, 274
Frankfurt/Main : Akad. Verl.gesellsch. 1964
103. LAWLEY, P.D.:
The action of alkylating agents on deoxyribonucleic acid.
J. Chim. Physique , Nr. 2392, 1011-1022 (1961)

104. LAWLEY, P.D.:
Effects of some chemical mutagens and carcinogens
on nucleic acids.
pp. 89-131 in: Progress in nucleic acid research
and molecular biology. Vol.V. DAVIDSON, J.N., and
COHN, W.E. (eds.)
New York, London : Academic Press 1966
105. LAWLEY, P.D., and BROOKES, P.:
The action of alkylating agents on deoxyribonucleic
acid in relation to biological effects of alkylating
agents.
In: The nucleus of the cancer cell, 1962
Expl. Cell Res. Suppl. 9, 512 (1963)
106. LAWLEY, P.D., and BROOKES, P.:
Molecular mechanism of the cytotoxic action of di-
functional alkylating agents and of resistance to
this action.
Nature (Lond.) 206, 480-483 (1965)
107. LAWLEY, P.D., and BROOKES, P.:
Interstrand crosslinking of DNA by functional alky-
lating agents.
J. Mol. Biol. 25, 143-160 (1967)
108. LEE, Y.C., BENNETT, L.R., and BYFIELD, J.E.:
Inhibition of single strand-breaks by antibiotics
and a normal metabolite. (Tagungsreferat)
Radiat. Res. 51, 435 (1972)
109. LEHNERT, Sh.:
The effect of cyclic AMP on the production of single-
strand-breaks in DNA of X-irradiated E. coli B/r.
Int. J. Radiat. Biol. 23, 11-21 (1973)
110. LISS, E.:
Einfluß alkylrierender Cytostatika auf biochemische
Parameter und die Transplantierbarkeit von Tumorzellen.
17. Colloq. Ges. physiol. Chemie, am 21.-23. April 1966
in Mosbach/Baden.
111. LISS, E. und PALME, G.:
Die Hemmung des Einbaus von ^{32}P in die DNS durch
Endoxan.
Naturwiss. 50, 336 (1963)

112. LISS, E. und PALME, G.:
Der Einfluß von alkylierenden Cytostatika auf den Nucleinsäurestoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Z. Krebsforschg. 66, 196-206 (1964)
113. LISS, E. und PALME, G.:
Der Einfluß von alkylierenden Cytostatika auf den Nucleinsäurestoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Mitt.dienst Ges. Bekämpfung d. Krebskr., Nordrhein-Westfalen e.V., Düsseldorf, 3, 457-487 (1964)
114. LISS, E., PALME, G. und OEFF, K.:
In vivo-Versuche über die Wirkung des Trenimons.
I. Veränderung biochemischer Parameter und Hemmung der Vermehrung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Z. Krebsforschg. 71, 89-97 (1968)
115. LISS, E., PALME, G. und OEFF, K.:
In vivo-Versuche über die Wirkung des Trenimons.
II. Vergleich von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und Normalgeweben.
Z. Krebsforschg. 71, 98-101 (1968)
116. LISS, E., REINICKE, A. und PALME, G.:
Die Hemmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS)-Synthese und die Beeinflussung der Zellvermehrung von Yoshida-Ascitestumorzellen durch alkylierende Substanzen.
Arzneimittel-Forschg. 19, 1137-1140 (1969)
117. LÖBER, G.:
Zur Komplexbildung von Farbstoffen mit Desoxyribonucleinsäuren.
Z. Chemie 9, 252-265 (1969)
118. MAASS, H., BUDDE, L. und RÜHLE, D.R.:
Die Wirkung von Actinomycin und Trisäthylenimino-benzochinon auf die DNS-Synthese in regenerierender Rattenleber.
Z. Krebsforschg. 74, 304-308 (1970)
119. MAGEE, P.N.:
Alkylation of nucleic acids and carcinogenesis.
17. Colloq. Ges. physiol. Chemie, am 21.-23. April 1966 in Mosbach/Baden.

120. MAMET-BRATLEY, M.D.:
Alkylated DNA as template in the synthesis of RNA
in vitro.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 247, 233-242 (1971)
121. MARMUR, J., ROUND, R., and SCHILDKRAUT, C.L.:
Denaturation and renaturation of deoxyribonucleic
acid. pp. 231-300 in Vol.I
New York and London : Academic Press 1963
122. MATAGA, N.:
Interaction between dyes and high-molecular anions.
J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. 40, 189-201 (1953)
123. MATSUHASHI, M., and KUMAGAI, K.:
Metachromatic reaction of oligophosphates.
Z. Physiol. Chem. 333, 140-142 (1963)
124. MATYÁŠOVÁ, J., and SKALKA, M.:
The effect of cytostatic alkylating agents on deoxy-
ribonucleoprotein complex of lymphatic and haemopoietic
tissue.
Neoplasma 13, 433-442 (1966)
125. MATYÁŠOVÁ, J., SKALKA, M., ČEJKOVÁ, M., and BLAZICEK, G.:
The effect of radiation on deoxyribonucleoproteins in
animal tissues. V. Action of various polyanions on de-
oxyribonucleoprotein of mouse spleen and thymus after
irradiation.
Fol. Biol. 17, 328-339 (1971)
126. MC CANN, J.J., LO, T.M., and WEBSTER, D.A.:
Crosslinking of DNA by alkylating agents and effects
on DNA function in the chick embryo.
Cancer Res. 31, 1573-1579 (1971)
127. MIURA, A., and OHBA, Y.:
Structure of nucleohistone. III. Interaction with to-
luidine blue .
Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 145, 436-445 (1967)
- 127a. MOSS, A.J.jr., DALRYMPLE, G.V., SANDERS, J.L., BAKER,
M.L., NASH, J.C., and WILKINSON, V.P.:
An in-vitro investigation of X-ray induced DNA chain
breakage using a dye binding technique. (Tagungsreferat)
Radiat. Res. 51, 437 (1972)

128. MÜLLER, A.:
Int. J. Radiat. Biol. 8, 131 (1964)
zitiert nach DERTINGER, H. und JUNG, H.
Molekulare Strahlenbiologie.
Berlin, Heidelberg, New York : Springer 1969
129. MÜLLER, A.:
Progr. Biophys. 17, 99 (1967)
zitiert nach ZIMMER, K.G.
Some recent studies in molecular radiobiology.
Curr. Top. Radiat. Res. 5, 1-38 (1969)
130. MÜLLER, W., and CROTHERS, D.M.:
Studies of the binding of Actinomycin and related compounds to DNA.
J. Mol. Biol. 35, 251-290 (1968)
131. MURTHY, V.V., BECKER, B.A., and STEELE, W.J.:
Evidence for alkylation of DNA as a molecular basis for cyclophosphamide teratogenicity in mice.
Fed. Proc. 31, Nr. 2209 (1972)
132. NEUBERT, D.:
Beeinflussung des Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsels durch Pharmaka.
Der Internist 7, 435-454 (1966)
133. NEUFANG, H.R.:
Zur Wirkung von Ganzkörperbestrahlung und 2,4,6-Tri-äthylenimino-1,3,5-triazin auf die Ausscheidung von Elektrolyten und Stoffwechselprodukten im Harn von Ratten.
Diss. med. vet. , München 1967
134. OBRECHT, P. und FUSENING, N.:
Zum Einfluß von 2,3,5-tris-Äthyleniminobenzochinon-(1,4) (Trenimon®) auf den Stoffwechsel.
Z. Krebsforschung 66, 498 (1965)
135. OBRECHT, P. und STRICKSTROCK, K.-H.:
Zur Frage der Wirkung alkylierender Substanzen auf Desoxyribonucleinsäure in vivo.
Arzneimittel-Forschg. 12, 850-851 (1962)

136. OKADA, S.:
DNA as target molecule responsible for cell killing.
pp. 103-147 in: Radiation biochemistry, Vol.I
ALTMANN, K.J., GERBER, G.B., and OKADA, S. (eds.)
New York, London : Academic Press 1970
137. PAINTER, R.B.:
Role of repair replication in recovery of mammalian
cells.
Stud. Biophys. 18, 1-10 (1969)
138. PAINTER, R.B.:
Repair of DNA in mammalian cells.
Curr. Top. Radiat. Res. Quart. 7, 45-70 (1970)
139. PAL, M.K., and SCHUBERT, M.:
Measurement of the stability of metachromatic com-
pounds.
J. Am. Chem. Soc. 84, 4384-4393 (1962)
140. PALCIC, B., and SKARSGARD, L.D.:
The effect of oxygen on DNA single-strand breaks pro-
duced by ionizing radiation in mammalian cells.
Int. J. Radiat. Biol. 21, 417-433 (1972)
141. PALCIC, B., and SKARSGARD, L.D.:
DNA single-strand breaks produced in mammalian cells
by ionizing radiation after treatment with 2,4-dini-
trophenol.
Int. J. Radiat. Biol. 21, 535-544 (1972)
142. PARTHIER, B.:
Antibiotica, molekularbiologische Wirkungsmechanis-
men.
Nova Acta Leopoldina 34, Nr. 188, 47 (1969)
143. PEACOCKE, A.R., and PRESTON, B.N.:
zitiert nach SCHOLLES, G., WARD, J.F., and WEISS, J.J.
Mechanism of the radiation induced degradation of
nucleic acids.
J. Mol. Biol. 2, 379 (1960)
144. POPA, L., and BOSCH, L.:
Interaction between toluidine blue and viral and
cellular nucleic acids.
Rev. Roum. Inframicrobiol. 7, 213-227 (1970)

145. POPA, L.M., and REPANOVICI, R.:
The study of toluidine blue ribosomal RNA complexes.
Biochim Biophys. Acta (Amst.) 182, 158-168 (1969)
146. PORTACALA, R., POPA, L., and SAMUEL, J.:
Chromatographic column fraction of a ribonucleic acid
subjected to ultraviolet irradiation.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 95, 185 (1965)
147. FUSCHENDORF, B., WOLF, H., and GRUNICKE, H.:
Effect of the alkylating agent Trisethyleneiminoben-
ziquinone (Trenimon) on the template activity of chromatin
and DNA in RNA and DNA polymerase systems.
Biochem. Pharmacol. 20, 3039-3050 (1971)
148. RAJEWSKY, B.:
Strahlendosis und Strahlenwirkung. 2. Aufl.
Stuttgart : Thieme 1956
149. RAMALINGAM, K., and RAVINDRANATH, M.H.:
Effects of ethanol on the metachromatic reaction of
toluidine blue O.
Stain Technol. 46, 221-226 (1971)
150. RAUEN, H.M.:
Chromatographie.
p.122 in: Handbuch der physiologischen und pathologisch-
chemischen Analyse, hrsg. von HOPPE-SEYLER und THIER-
FELDER, 1. Band.
Berlin, Göttingen, Heidelberg : Springer 1953
151. ROBERTS, J.J., PASCOE, J.M., PLANT, J.E., STURROCK, J.E.,
and GRATHORN, A.R.:
Quantitative aspects of the repair of alkylated DNA in
cultured mammalian cells. I. The effect on HeLa and
Chinese hamster cell survival of alkylation of cellu-
lar macromolecules.
Chem. Biol. Interactions 3, 29-47 (1971)
152. ROBERTS, J.J., PASCOE, J.M., SMITH, B.A., and GRATHORN,
A.R.:
Quantitative aspects of the repair of alkylated DNA in
cultured mammalian cells. II. Non-semiconservative DNA
synthesis ("repair synthesis") in HeLa and Chinese
hamster cells following treatment with alkylating
agents.
Chem. Biol. Interactions 3, 49-68 (1971)

153. ROSS, W.S.J.:
Biological alkylating agents.
London : Butterworths 1962
154. ROSS, A.E., KEEFER, L., and LIJINSKY, W.:
Alkylation of nucleic acids of rat liver and lung
by deuterated N-nitrosodiethylamine in vivo.
J. Nat. Cancer Inst. 47, 789-795 (1971)
155. ROSSBERG, L.:
Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf das UV-Absorp-
tionsspektrum von DNS Lösungen.
Strahlentherapie 121, 443-449 (1963)
156. RUDDON, R.W., and JOHNSON, J.M.:
The effect of nitrogen mustard on DNA template acti-
vity in purified DNA and RNA polymerase systems.
Molec. Pharmacol. 4, 258-273 (1968)
157. SÄBEL, M. und MITZNEGG, P.:
DNS- und RNS-Neubildung in der Leber männlicher weißer
Mäuse nach einmaliger Ganzkörperbestrahlung.
Strahlentherapie 141, 258-260 (1971)
158. SAVITZKY, P., and STAND, F.:
A method for the preparation of mammalian deoxyribo-
nucleic acid.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 114, 419-422 (1966)
159. SAWADA, S., and OKADA, S.:
Cysteamine, cystamine, and single-strand breaks of
DNA in cultured mammalian cells.
Radiat. Res. 44, 116-132 (1970)
160. SCAIFE, J.F.:
DNA repair in thymus lymphocytes after irradiation.
Int. J. Radiat. Biol. 21, 197-200 (1972)
161. SCHANS, G.P. van der, BLEICHRODT, J.F., and BLOK, J.:
Contribution of various types of damage to inactiva-
tion of a biologically-active double-stranded circu-
lar DNA by gamma-radiation.
Int. J. Radiat. Biol. 23, 133-150 (1973)

162. SCHÄFER, P. und HAGEN, U.:
Veränderungen der Desoxyribonukleinsäurestruktur
beim akuten Zelltod nach Ganzkörperbestrahlung.
Atompraxis 11, 41-45 (1965)
163. SCHMID, A.:
Über den Wirkungsmechanismus ionisierender Strahlung
am biologischen objekt.
Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 76, 84 (1963)
164. SCHMIDT, K.H.:
Die pharmakologischen und chemotherapeutischen Wirkungen der Radiomimetika.
Strahlentherapie 27, 29 (1955)
165. SCHNEIDER, W.C.:
Phosphorus compounds in animal tissues. II. A comparison of methods for the estimation of nucleic acid.
J. Biol. Chem. 164, 747 (1946)
166. SCHOLES, G.:
The radiation chemistry of aqueous solutions of nucleic acids and nucleoproteins.
Progr. Biophys. Chem. 13, 59-104 (1963)
167. SCHOLES, G., WARD, J.E., and WEISS, J.J.:
J. Mol. Biol. 2, 379 (1960)
zitiert nach LATARJET, R.
Interaction of radiation energy with nucleic acids.
Curr. Top. Radiat. Res. Quart. 8, 1-38 (1972)
168. SCHOLES, G., and WEISS, J.J.:
J. expl. Cell Res. Suppl. 2, 219 (1952)
zitiert nach DERTINGER, H. und JUNG, H.
Molekulare Strahlenbiologie.
Berlin, Heidelberg, New York : Springer 1969
169. SCHÖN, M.:
Energiewanderung in Molekülkomplexen und Struktureinheiten.
21 d. Fiat-Berichte (Naturforschung und Medizin in Deutschland (1939-1946)), hrsg. von RAJEWSKY, B. und SCHÖN, M.
170. SCHOENBERG, M.D., and MOORE, R.D.:
The conformation of hyaluronic acid and chondroitin sulfate C: The metachromatic reaction.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 83, 42-51 (1964)

171. SCOTT, J.E.:
Patterns of specificity in the interaction of organic cations with acid mucopolysaccharides.
Chem. Physiol. Mucopolysacch. Proc. Symp. Milan, pp. 219-231, 1965 (Publ. 1968)
172. SEMMEL, M., and HUPPERT, J.:
Effect of degree of polymerization of ribonucleic acids in their reaction with basic dyes.
Compt. Rend. 254, 3746-3748 (1962)
173. SEMMEL, M., and HUPPERT, J.:
The role of hydrogen bonds in the interaction of ribonucleic acid (RNA) and basic dyes.
Compt. Rend. 256, 5649-5652 (1963)
174. SEMMEL, M., and HUPPERT, J.:
The interaction of basic dyes with ribonucleic acid.
Arch. Biochim. Biophys. 108, 158-168 (1964)
175. SINGH, C.:
Paper-chromatographic detection of nucleic acids with basic dyes.
J. Sci. Ind. Res. 19c, 78-80 (1960)
176. SINGH, C.:
Simple technique for a stoichiometric study of meta-chromatic complexes of basic and acid dyes.
Anal. Biochem. 38, 564-568 (1970)
177. SKALKA, M., and MATYÁŠOVÁ, J.:
The effect of radiation on deoxyribonucleoproteins in animal tissues. II. The relationship between the radiation dose and the amount of deoxyribopolynucleotides in radiosensitive tissues after a single and repeated irradiation.
Pol. Biol. 11, 378-387 (1965)
178. SKALKA, M., and MATYÁŠOVÁ, J.:
The effect of low radiation doses on the release of deoxyribonucleotides in haematopoietic and lymphatic tissues.
Int. J. Radiat. Biol. 7, 41-44 (1963)

179. SKALKÁ, M., MATYÁŠOVÁ, J., and GEJKOVÁ, M.:
Reaction of deoxyribonucleoprotein of lymphatic
tissues with polyanions after irradiation and treat-
ment with nitrogen mustards.
Stud. biophys. 7, 105-110 (1968)
180. SKALKÁ, M., MATYÁŠOVÁ, J., and CHLUMBECKÁ, V.:
The effect of radiation in deoxyribonucleoproteins
in animal tissues. I. The time course of the release
of deoxyribopolynucleotides in different tissues
after irradiation in vivo.
Fol. Biol. 11, 113-122 (1965)
181. SMITH, K.C.:
Roles of genetic recombination and DNA polymerase in
the repair of damaged DNA.
Photophysiol. 6, 209-278 (1971)
182. STERNBERG, S.S., PHILIPS, F.S., and SCHOLLER, J.:
Pharmacological and pathological effects of alkylating
agents.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 811 (1957/58)
183. STONE, A.L., and BRADLEY, D.F.:
Aggregation of cationic dyes on acid polysaccharides.
I. Spectrophotometric titration with acridine orange
and other metachromatic dyes.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 148, 172-192 (1967)
184. STRAUSS, B.S.:
DNA repair mechanisms and their relation to mutation
and recombination.
Curr. Top. Microbiol. Immun. 44, 1-85 (1968)
185. STRAZHEVSKAYA, N.B., and STRUCHOV, V.A.:
Post-irradiation repair of the single and double-
strand breaks in euchromatin and heterochromatin
DNA of thymus and liver of gamma-irradiated rats.
Radiobiologiya 12, 498-503 (1972)
186. STREFFER, C.:
Veränderungen der Nucleinsäuren und ihres Stoffwech-
sels nach Bestrahlung.
pp. 22-69 in: Strahlenbiochemie.
Berlin, Heidelberg, New York : Springer 1969

187. SUCIU, D., URAY, Z., and MUSTEA, I.:
In vivo fragmentation of rat spleen DNA after administration of bifunctional nitrogen mustards.
Stud. biophys. 20, 131-138 (1970)
188. SWINGLE, K.F., and COLE, L.J.:
Radiation induced free polydeoxyribonucleotides in lymphoid tissues: A product of the action of neutral deoxyribonuclease (DNase I).
Radiat. Res. 30, 81-95 (1967)
189. SWINGLE, K.F., and COLE, L.J.:
Early effects of ionizing radiations on nucleic acids: Curr. Top. Radiat. Res. 4, 190-250 (1968)
190. SZYBALSKI, W., and IYER, V.N.:
Crosslinking of DNA by enzymatically or chemically activated Mitomycin and Porfiramycins, biofunctionally "alkylating" antibiotics.
Fed. Proc. 23, 946 (1964)
191. TARNOK, J. und RÖHRSCHEIDT, E.:
Spektrum der Desoxyribonucleinsäure (DNS) im Bereich von 185-280 mμ und seine Beeinflussung durch verschiedene Substanzen.
Z. Naturforschg. 23b, 609-615 (1968)
192. TEMPEL, K.:
Zur Metachromasie von Toluidinblau in Gegenwart von Nucleinsäuren.
Z. Naturforschg. 24b, 1279-1283 (1969)
193. TEMPEL, K.:
Fermentaktivierung unter dem Einfluß von ionisierenden Strahlen und Radiomimetika am Beispiel der Desoxyribonuclease II.
Berlin, Hamburg : Parey 1968
194. TEMPERLEY, H.N.V.:
Trans. Farad. Soc. 55, 515 (1959)
zitiert nach DERTINGER, H. und JUNG, H.
Molekulare Strahlenbiologie.
Berlin, Heidelberg, New York : Springer 1969

195. TRAMS, G., MAASS, H. und KIRSCHBAUM, E.:
Einfluß von Röntgenstrahlen auf den RNS-Stoffwechsel
in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Biophys. 7, 259-268 (1971)
196. TYRAWSKA-SPICHALOWA, D., GRABROWSKA, B., ROZGA, B.,
and KAMINSKA, A.:
The effect of γ -radiation on the structure of DNA and
the deoxyribonucleoprotein isolated from irradiated
lymphatic glands.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 254, 40-47 (1971)
197. ULLRICH, M. und HAGEM, U.:
Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrück-
en in der Desoxyribonucleinsäure.
Z. Naturforschg. 23b, 1176-1183 (1968)
198. ULLRICH, M., and HAGEN, U.:
Base liberation and concomitant reactions in irradiat-
ed DNA solution.
Int. J. Radiat. Biol. 19, 507-517 (1971)
199. VENNER, H. und ZIMMER, L.:
Biopolymers 4, 321 (1966)
zitiert nach LÖBLER, G.
Zur Komplexbildung von Farbstoffen mit Desoxyribo-
nucleinsäuren.
Z. Chemie 2, 252-265 (1969)
200. VOGT, M. und HARBERS, E.:
Untersuchungen an Nukleohistonen. III. Wirkung von
Röntgenstrahlen.
Strahlentherapie 133, 426-433 (1967)
201. WALKER, I.G. :
J. Mol. Biol. 14, 381 (1965)
zitiert nach LÖBLER, G.
Zur Komplexbildung von Farbstoffen mit Desoxyribo-
nucleinsäuren.
Z. Chemie 2, 252-265 (1969)
202. WALKER, I.G.:
Intrastrand bifunctional alkylation of DNA in mamma-
lian cells treated with mustard gas.
Can. J. Biochem. 42, 332-336 (1971)

203. WALPOLE, A.L.:
The pharmacology of alkylating agents.
pp. 17-29 in: The treatment of cancer.
MITCHELL, J.S. (ed.), 1965
204. WALTON, K.W., and RICKETTS, C.R.:
Investigation of the histochemical basis of meta-
chromasy.
Brit. J. expl. Path. 35, 227 (1954)
205. WALWICK, E.R., and MAIN, R.K.:
Stability of a deoxyribonucleic acid-synthesizing
system to X-radiation.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 55, 225-227 (1962)
206. WARWICK, G.P.:
The mechanism of action of alkylating agents.
Cancer Res. 23, 1315-1333 (1963)
207. WEISS, J.J.:
Chemical effects of ionizing radiations on nucleic
acids and related compounds.
pp. 104-181 in: Progress in nucleic acid research
and molecular biology. Vol. III, DAVIDSON, J.N.,
and COHN, W.E. (eds.)
New York, London : Academic Press 1964
208. WEINERT, H. und HAGEN, U.:
Über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonu-
kleinsäure im Chromatin.
Strahlentherapie 136, 204-212 (1968)
209. WHEELER, G.P.:
Studies related to the mechanisms of action of
cytotoxic alkylating agents: A review.
Cancer Res. 22, 651-688 (1962)
210. WHEELER, G.P., and ALEXANDER, J.A.:
Studies with mustards. V. In vivo fixation of C¹⁴
of labelled alkylating agents by bilaterally grown
sensitive and resistant tumors.
Cancer Res. 24, 1331 (1964)

211. HEELER, G.P., and STEPHENS, Z.H.:
Studies with mustards. VII. Effects of alkylating
agents in vitro and in vivo on the thermal properties
of desoxyribonucleic acids from sensitive and
resistant plasmacytoms.
Cancer Res. 25, 410 (1965)
212. WINANS, L.F., DEWEY, W.C., and DETTOR, C.M.:
Repair of sublethal and potentially lethal X-ray
damage in synchronous Chinese hamster cells.
Radiat. Res. 52, 333-351 (1972)
213. YEN, T.F., DAVAR, M., and REMBAUM, A.:
The structure of heparin: Interaction of heparin
with basic dyes by visible spectrometry.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 184, 646-648 (1969)
214. YIELDING, K.L., and GAUDIN, D.:
Enhancement of tumor response to X-ray and alkylating
agents by the excision repair inhibitor Daffeine and
Chloroquine.
Sym. Fundam. Cancer Res. 23, 523-527 (1970)
215. ZIMMER, K.G.:
Some recent studies in molecular radiobiology.
Curr. Top. Radiat. Res. 5, 1-38 (1969)
216. ZIMMER, K.G., and MÜLLER, A.:
Curr. Top. Radiat. Res. 1, 1 (1964)
zitirt nach DERTINGER, H. und JUNG, H.
Molekulare Strahlenbiologie.
Berlin, Heidelberg, New York : Springer 1969
217. ZIMMERMAN, F.K., KRÖGER, H., and LÜCKING, T.:
Interaction of RNA polymerase with irradiated DNA.
Biochem. Z. 342, 115-119 (1965)

LEBENS LAUF

Name	Andrew Ozdy geb. András Özdi
geboren	am 23.5. 1946 in Budapest (Ungarn)
Eltern	der Uhrmacher Lipót Özdi und seine Ehefrau Livia geb. Mezei
Volksschule	1952 - 1956 in Budapest (Ungarn) 1956 - 1960 in Los Angeles (U.S.A.)
Höhere Schule	1960 - 1964 Beverly Hills High School in Beverly Hills (U.S.A.)
College	1964 - 1966 San Fernando Valley State College in Kalifornien Preveterinary Curriculum
Hochschule	1966 - 1971 Studium der Tiermedizin an der Universität München 1971 Staatsexamen 1972 Erlaubnis zur vorübergehenden Ausübung des tierärztlichen Berufs
verheiratet	seit 1971 mit der Tierärztin Dore Ozdy geb. Häussler

Für die Überlassung des Themas und für die hervorragende Unterstützung und Beratung bei meinen Untersuchungen sowie für die Durchsicht meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Tempel danken.

